

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Organická chemie



Bc. Adéla Provazníková

SYNTÉZA SULFANYLAMINODERIVÁTŮ CYKLODEXTRINŮ A POČÍTAČOVÁ  
SIMULACE TVORBY JEJICH KOMPLEXŮ

Synthesis of sulphanylamino derivatives of cyclodextrins and computational  
simulations of their complexes formation

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jindřich Jindřich, CSc.

Konzultant: RNDr. Ivan Barvík, Ph.D.

Praha 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 8. 2016

Podpis

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jindřichu Jindřichovi, CSc. za trpělivý přístup při vedení této diplomové práce a za ochotu pomoci při řešení problémů. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi RNDr. Ivanu Barvíkovi, Ph.D., pod jehož vedením byla vypracována výpočetní část práce, za instruktáž a konzultace týkající se molekulové dynamiky. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým kolegům z laboratoří 135 a 131 za cenné rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Za měření 2D NMR spekter bych ráda poděkovala RNDr. Simoně Hybelbauerové Ph.D. a Mgr. Janu Blahutovi a za měření MS spekter RNDr. Martinu Štíchovi, RNDr. Janě Polákové a Mgr. Petru Kasalovi.

Dále bych ráda poděkovala skupině Teoretické a výpočetní biofyziky na Univerzitě v Illinois za poskytnutí volně dostupných výpočetních programů VMD a NAMD.

Velký dík patří celé mé rodině a přátelům za všeobecnou podporu v mém studiu i mimo něj.

## Obsah

Seznam použitých zkratk .....	6
Abstrakt .....	8
1 Úvod .....	10
2 Cíle diplomové práce .....	11
3 Teoretická část.....	12
3.1 Cyklodextriny .....	12
3.1.1 Inkuzní komplexy cyklodextrinů .....	13
3.1.2 Ligandy.....	15
3.1.3 Vazebná energie .....	16
3.1.4 Využití CD.....	17
3.2 Monosubstituované deriváty CD.....	18
3.2.1 Strategie přípravy monosubstituovaných derivátů CD a jejich selektivní modifikace .....	19
3.2.2 6 <sup>l</sup> -O- <i>p</i> -Toluensulfonyl-cyklodextrin .....	19
3.2.3 Využití monosubstituovaných CD.....	20
3.2.4 Příprava 6 <sup>l</sup> -deoxy-CD substituovaných přes atom dusíku spojkou nesoucí sulfanylovou nebo disulfidickou skupinu .....	21
3.3 Chemosenzory založené na cyklodextrinech .....	23
3.3.1 Molekulární mechanismus detekce .....	23
3.3.2 Solvatochromní efekt .....	25
3.3.3 Fluorofory .....	26
3.4 Molekulová dynamika .....	28
3.4.1 Matematický aparát programu NAMD <sup>112</sup> .....	28
3.4.2 Výpočet relativní vazebné energie $\Delta G_{b,rel}$ .....	30
4 Výsledky a diskuse .....	33
4.1 Syntéza .....	33
4.1.1 Oligoethylenglykolové spojky.....	34
4.1.2 6 <sup>l</sup> -((6-Amino-3,4-dithiahexan-1-yl)amino)-6 <sup>l</sup> -deoxy- $\beta$ -cyklodextrin .....	37
4.1.3 $\beta$ -CD-NH-OEG-S-S-OEG-NH <sub>2</sub> .....	42
4.2 Molekulová dynamika .....	45
4.2.1 Simulace inkluze ligandů do kavity $\beta$ -cyklodextrinu.....	45
4.2.2 Výpočet relativních vazebných energií $\Delta G_{b,rel}$ .....	48
4.2.3 Simulace cílových derivátů $\beta$ -CD ve vodném roztoku .....	49
4.2.4 Model cyklodextrinového chemosenzoru ve vodném roztoku.....	51

5 Závěr .....	53
6 Experimentální část .....	54
6.1 Syntéza .....	54
6.1.1 Chemikálie a přístroje.....	54
6.1.2 Pracovní postupy .....	56
6.2 Molekulová dynamika .....	68
6.2.1 Inkluze ligandů do $\beta$ -CD.....	68
6.2.2 Výpočet relativní vazebné energie .....	70
6.2.3 Simulace cílových derivátů $\beta$ -CD .....	71
6.2.4 Simulace konjugátu $\beta$ -CD – sklo – akrylodan .....	72
Použitá literatura .....	73

## Seznam použitých zkratk

Ac	acetyl
Bu	butyl
CD	cyklodextrin
CGTáza	cyklodextrinová glukosyltransferáza
COSY	„ <i>correlation spectroscopy</i> “
CSD	„ <i>Cambridge structural database</i> “ (Cambridgeská strukturní databáze)
d	dublet
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	„ <i>deoxyribonucleic acid</i> “ (kyselina deoxyribonukleová)
DTE	dithioerythriol
DTT	dithiothreitol
Ekv.	ekvivalent
ESI	„ <i>electrospray ionization</i> “ (elektrosprejová ionizace)
Et	ethyl
FEP	„ <i>free energy perturbation</i> “
FT-IR	„ <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> “ (infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací)
HMBS	„ <i>heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i> “
HPLC	„ <i>high-performance liquid chromatography</i> “
HRMS	„ <i>high-resolution mass spectrometry</i> “
HSQC	„ <i>heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i> “
ICT	„ <i>intramolecular charge transfer</i> “ (intramolekulární přenos náboje)
L	ligand
m	multiplet
MD	molekulární dynamika, molekulárně dynamický
Me	methyl
MS	„ <i>mass spectrometry</i> “ (hmotnostní spektrometrie)
NAMD	„ <i>nanoscale molecular dynamics</i> “
NMR	nukleární magnetická rezonance
OEG	oligoethylenglykol

PET	<i>„photon-induced electron-transfer“</i>
R <sub>f</sub>	retardační faktor
RVO	rotační vakuová odparka
s	singlet
t	triplet
TLC	<i>„thin layer chromatography“</i> (tenkovrstevná chromatografie)
Tosyl	<i>O-p</i> -toluensulfonyl
UV	<i>„ultraviolet“</i> (ultrafialová)
VMD	<i>„visual molecular dynamics“</i>

## Abstrakt

Tato diplomová práce pojednává o syntéze série 6'-*N*-monosubstituovaných  $\beta$ -CD, jejichž substituentem je různě dlouhý lineární řetězec obsahující disulfidickou vazbu a zakončený aminoskupinou.

Celá série byla úspěšně připravena prostřednictvím nukleofilní substituce toluensulfonylové skupiny tosyl- $\beta$ -CD diaminovou spojkou. V případě vazby nejkratší spojky (cystaminu) byl derivát připraven ve výtěžku 35 %. Při syntéze derivátů substituovaných spojkami odvozenými od di-, tri- a tetraethylenglyku byla výtěžnost dvojnásobná a pohybovala se mezi 66 a 85 %. Všechny tři spojky byly připraveny pomocí standardních chemických přeměn. Pro izolaci výsledných derivátů byly vyvinuty optimální soustavy založené na *n*-butanolu. Abychom lépe pochopili chování cílových derivátů v roztoku, byly provedeny jejich molekulárně dynamické (MD) simulace.

Látky byly připravovány pro použití při vývoji fluorescenčních chemosenzorů. Za stejným účelem byla studována inkluze vybraných organických molekul do kavity  $\beta$ -CD pomocí molekulové dynamiky a optimalizována metoda pro MD výpočet jejich relativních vazebných energií. Přestože se ani po optimalizaci metoda nezdá dostatečně přesná, výsledky odpovídají řádem i znaménkem experimentálním hodnotám.



## Abstract

This master thesis deals with synthesis of 6'-*N*-monosubstituted  $\beta$ -CD bearing a linear spacer of various lengths containing disulfidic bond and terminated by amine.

Whole series was successfully prepared by nucleophilic substitution of toluenesulfonyl group on tosyl  $\beta$ -CD by a spacer's amine group. In case of the shortest spacer (cystamine) 35 % yield was achieved. Synthesis of  $\beta$ -CD derivatives using longer and more lipophilic spacer derived from di-, tri- and tetraethylenglycol yielded 66 to 85 %. The oligoethylene spacers were prepared by standard chemical modifications. A separation method using *n*-butanol elution mixtures was optimized for isolation of  $\beta$ -CD derivatives. To better understand the  $\beta$ -CD derivative behavior in solution, molecular dynamics (MD) computations were used.

The synthesized species were intended to be used for fluorescent sensor construction. For the same reason the inclusion of small organic molecules in  $\beta$ -CD cavity was studied with molecular dynamic simulations. MD method for computation of relative binding energy was optimized and gave values of right sign and order of magnitude.

## 1 Úvod

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy skládající se z  $\alpha$ -D-glukopyranosových podjednotek spojených (1→4)glykosidickou vazbou. Díky své cyklické stuktuře disponují CD dutinou, do které mohou vstupovat menší molekuly a tvořit tak supramolekulární komplexy typu hostitel-host. Tvorba tohoto tzv. inkluzního komplexu má často za následek změnu fyzikálních, chemických i biologických vlastností inkludované molekuly. Od tohoto chování CD se odvíjí jejich široké využití ve farmaceutickém, potravinářském, kosmetickém a chemickém průmyslu.<sup>1</sup>

Díky četným hydroxylovým skupinám lze CD derivatizovat a dále tak rozšiřovat úplatnění těchto látek. Molekuly CD substituované lineárním řetězcem je možné imobilizovat na pevných površích, odkud plyne jejich další využití jako např. jako mimetika enzymů,<sup>2,3</sup> cílené transportéry léčiv,<sup>4,5</sup> pro vychytávání toxinů z vody<sup>6</sup> a v neposlední řadě konstrukce molekulárních chemosenzorů.<sup>7</sup>

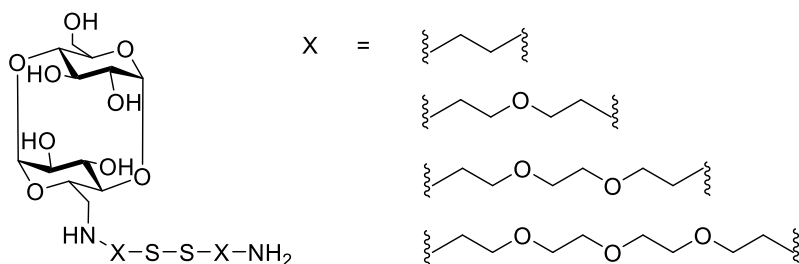
## 2 Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce byla zejména příprava derivátů  $\beta$ -cyklodextrinu substituovaných v poloze 6 disulfidickou spojkou zakončenou aminovými skupinami, přičemž jedna z těchto skupin byla vázána na molekulu CD (obrázek 1). Tyto deriváty by měly posloužit jako prekurzory pro přípravu své redukované (thiolové) formy, která by měla být schopná imobilizovat molekulu  $\beta$ -CD na površích nesoucích allylové či epoxidové skupiny nebo površích pokrytých vrstvou zlata.

Zamýšlené využití výsledných derivátů spočívá ve vazbě na modifikovaný skleněný povrch za účelem vývoje fluorescenčního chemosenzoru. Kromě derivatizovaného CD by měla být součástí senzoru i molekula solvatochromního fluoroforu imobilizovaná na témže povrchu. Fluorofory tohoto typu byly předmětem studia v druhé části práce věnované výpočetním metodám.

Cíle této diplomové je možné shrnout do následujících bodů:

- Syntéza disulfidických spojek zakončených aminovými skupinami
- Příprava derivátu  $\beta$ -CD substituovaného molekulou cystaminu přes atom dusíku, optimalizace reakčních podmínek a separačních technik
- Syntéza série derivátů  $\beta$ -CD substituovaných přes atom dusíku oligoethylenglykolovými spojkami v disulfidické formě
- Výpočet relativních vazebných energií vybraných molekul s  $\beta$ -CD za použití molekulové dynamiky (MD), optimalizace metody pro její využití ke studiu solvatochromních fluoroforů
- MD simulace konjugátu  $\beta$ -CD–skleněný povrch–solvatochromní fluorofor ve vodném roztoku

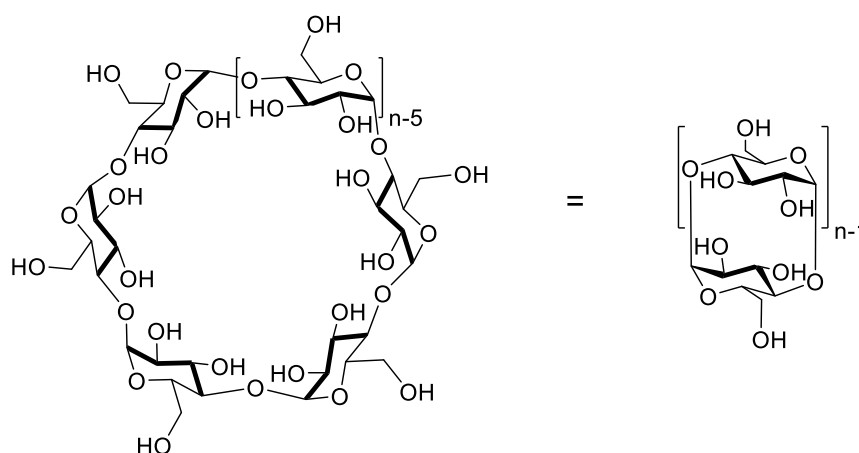


Obrázek 1 - Cílové deriváty syntetické části této diplomové práce.

## 3 Teoretická část

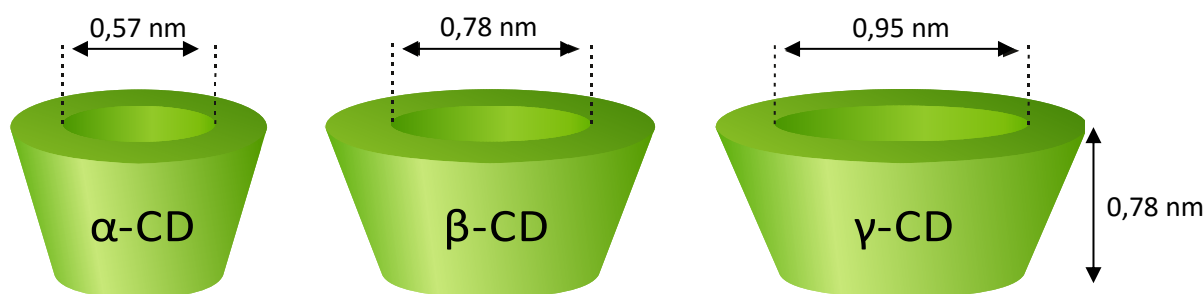
### 3.1 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou látky vznikající enzymatickou degradací škrobu. Jedná se o cyklické oligosacharidy skládající se z  $\alpha$ -D-glukopyranosových podjednotek spojených (1 $\rightarrow$ 4)glykosidickou vazbou (obrázek 2). CD patří do skupiny kavitandů, které jsou schopné tvořit supramolekulární komplexy typu hostitel-host s mnoha organickými sloučeninami a modifikovat tak jejich fyzikální, chemické i biologické vlastnosti. Od těchto vlastností CD se odvíjí jejich široké využití ve farmaceutickém, potravinářském, kosmetickém a chemickém průmyslu.<sup>1</sup>



**Obrázek 2 - Struktura molekul CD. Mezi nejběžnější typy patří  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD, které mají po řadě  $n = 6, 7$  a  $8$  podjednotek.**

Cyklodextriny vděčí za toho chování své cyklické struktury obsahující dutinu (kavitu) a celá molekula tak připomíná dutý komolý kužel (obrázek 3). Počet glukosových podjednotek udává velikost a tvar kavity, přičemž nejpopulárnější jsou CD obsahující 6, 7 nebo 8 molekul glukosy, které bývají označovány jako  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD<sup>1</sup> (obrázek 2).

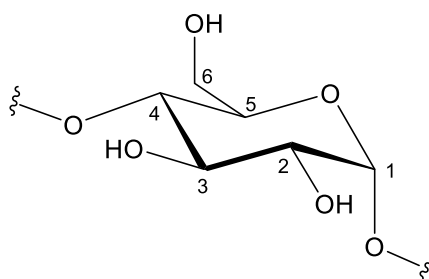


**Obrázek 3 - Tvary molekul CD v prostoru spolu průměry jejich kavit.<sup>1</sup>**

Při výrobě CD se používají cykloextrinové glukosyl-transferázy (CGTázy), které jsou schopny katalyticky degradovat škrob. Selektivita a výtěžek závisí zpravidla na typu CGTázy a dostupných substrátech. Pro průmyslovou výrobu se používá především bramborový škrob. Zajímavostí je, že komplexační schopnosti CD jsou determinovány již při jejich enzymatické tvorbě, neboť několik glukosových podjednotek je při tomto procesu organizováno kolem aromatického jádra tyrosinu, který se vyskytuje ve všech známých typech enzymu CGTázy<sup>8,9</sup>.

Mechanismus vzniku cykloextrinů v aktivním místě CGTázy pravděpodobně spočívá ve vazbě několika glukosových podjednotek substrátu do vazebného místa enzymu (CGTáza izolovaná z jednoho kmene *Bacillus circulans* disponuje devíti vazebnými místy pro cukernou podjednotku<sup>9</sup>), štěpení glykosidické vazby polysacharidu a následném přiblížení krajních jednotek vzniklého oligosacharidu (což vyžaduje 23 Å dlouhý pohyb zatím lineárního řetězce)<sup>10</sup>. Tento krok je považován na základě kinetických studií za krok udávající rychlost reakce<sup>9</sup> a předchází cyklizaci oligosacharidu. Existuje mnoho typů CGTáz v závislosti na kmenu bakterií, ze kterého byly izolovány, nicméně v současné době bývají CGTázy geneticky upravené pro dosažení optimálního výtěžku a selektivity<sup>8</sup>.

V celé práci bude používáno běžné číslování sacharidového řetězce<sup>11</sup> a pro označení hydroxylových skupin budou používány polohy na uhlovodíkovém řetězci (obrázek 4).

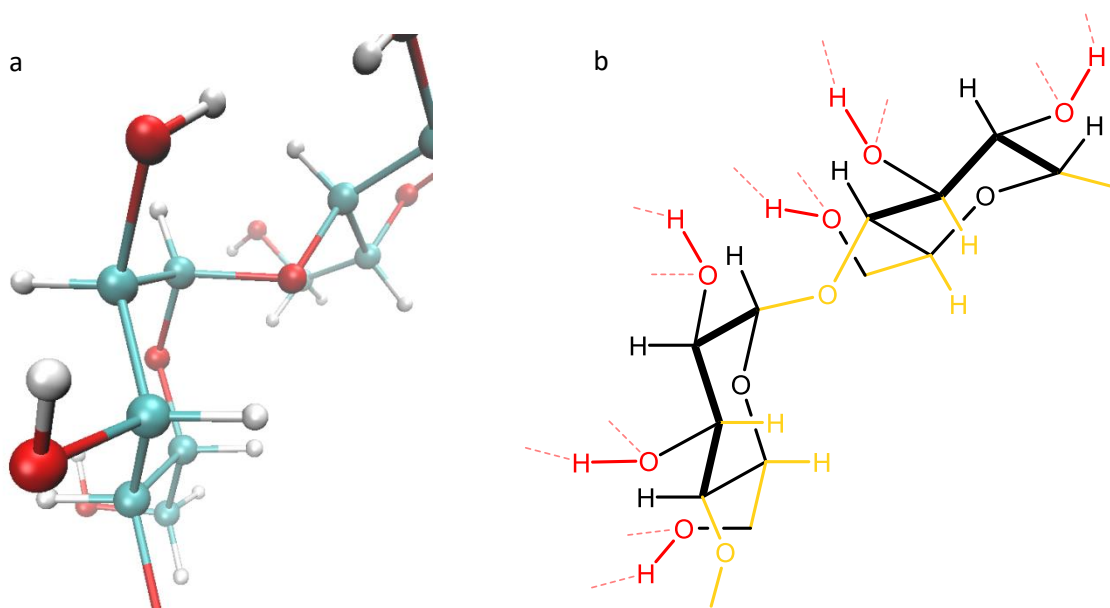


**Obrázek 4 - Číslování sacharidového řetězce**

### 3.1.1 Inkuzní komplexy cykloextrinů

Z krystalové struktury CD je zřejmé, že hydroxyly v polohách 2 a 3 tvoří širší část kuželovité molekuly CD, tzv. sekundární okraj, zatímco hydroxyskupiny na C6 tvoří užší okraj CD, tzv. primární (obrázek 5). Ve vodném prostředí je většina těchto hydroxylů (především na C3 a C6) orientována směrem vně kavity CD. Nepolární C-H vazby na C3 a C5 směřují dovnitř spolu s etherickými atomy kyslíku zprostředkujícími glykosidickou vazbu mezi glukosovými podjednotkami. Cykloextriny takto vytváří tzv. mikro-heterogenní prostředí díky svému

hydrofilnímu povrchu a hydrofobní dutině (obrázek 5). Polarita mikrookolí v kavitě CD byla přirovnána k vodnému roztoku ethanolu.<sup>2</sup>



**Obrázek 5 - Zobrazení hydrofilního povrchu a hydrofobní kavity molekuly CD a) prostorové zobrazení pomocí krystalové struktury  $\beta$ -CD<sup>12</sup> (barevné rozlišení atomů: červeně O, modře C, bíle H), b) schématické znázornění - červeně jsou zvýrazněny polární skupiny spolu s potenciálními vodíkovými můstky, žlutě jsou označeny nepolární vazby C-H a C-O.**

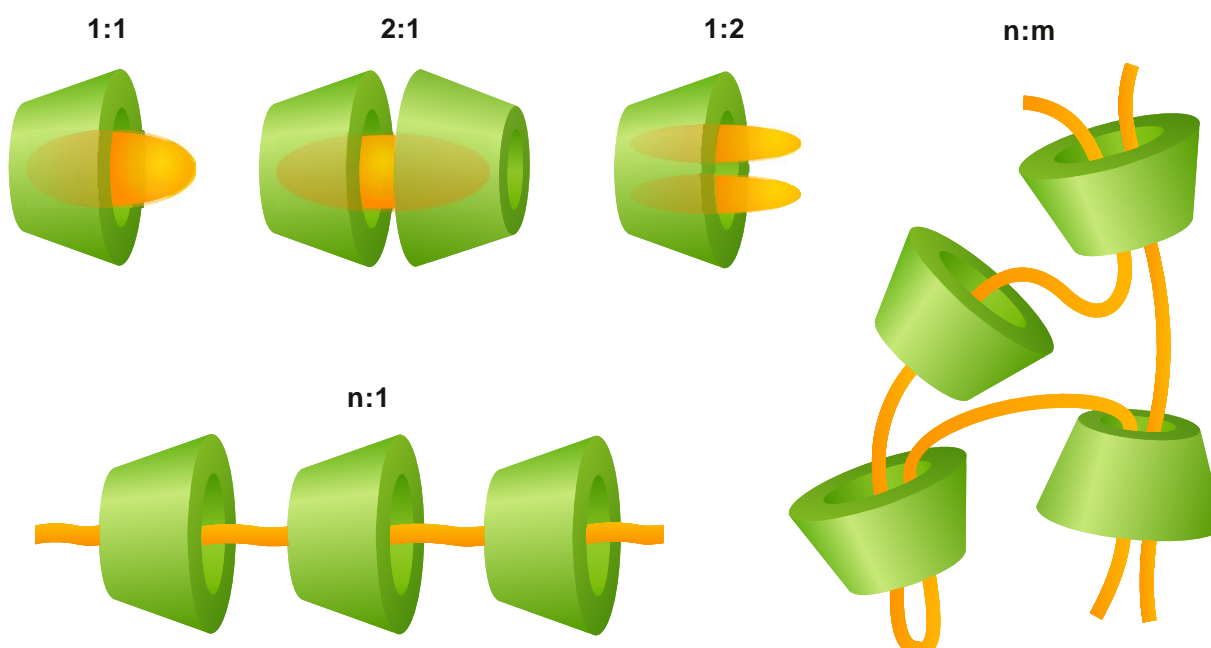
Díky zmíněným vlastnostem CD jsou tyto molekuly schopné tvořit nekovalentní agregáty s hydrofobními organickými molekulami, které mohou díky své sterické kompatibilitě vstoupit do kavity CD, a obklopit se tak méně polárním prostředím než jim nabízí okolní rozpouštědlo (většinou voda). Pro tyto agregáty se ustálilo označení „inkluzní komplexy“ nebo také komplexy „hostitele“ (CD) a „hosta“ (inkludovaná molekula).<sup>1,2</sup> V této práci bude pro molekulu hosta užíváno především označení „ligand“, které bylo převzato z biochemických publikací.<sup>13</sup>

Četné studie ukázaly, že při inkluzi se molekula ligandu orientuje tak, aby maximalizovala kontakt své hydrofobní části s kavitou CD. Zároveň se zvyšující se hydrofobicitou molekuly hosta se zvyšuje i stabilita celého komplexu.<sup>1</sup>

Hlavní hybnou silou při tvorbě inkluzních komplexů je hydrofobní efekt spolu s van der Waalsovskými interakcemi. Nezanedbatelnou roli hrají ovšem i sterické faktory (molekula ligandu musí být s kavitou stericky kompatibilní) a tvorba vodíkových můstků mezi hydroxyly CD, polárními částmi ligandu a molekulami rozpouštědla.<sup>14</sup>

Liu and Guo<sup>15</sup> ukázali, že voda přítomná v kavitě CD nemá vliv na míru komplexace a vyvracejí tím často přijímaný závěr, že jedním z hlavních hybných mechanismů komplexace je vytlačení „vysokoenergetické“ vody z kavity CD hydrofobním ligandem.<sup>16</sup>

Nejčastější stechiometrický poměr molekul cyklodextrinu a ligandu je 1:1, nicméně v závislosti na vlastnostech ligandu je možné pozorovat i další poměry<sup>17,18,19,20</sup> (2:1, 1:2, 2:2,..., n:1,..., n:m, obrázek 6).

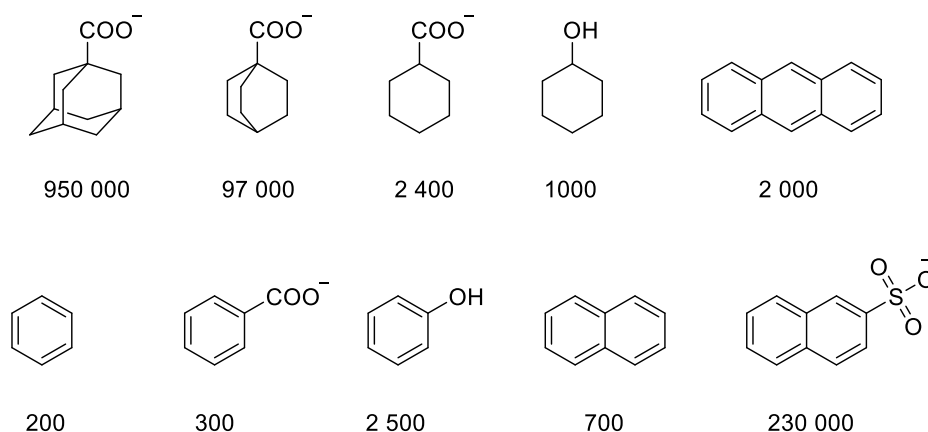


**Obrázek 6 - Schématické znázornění inkluzních komplexů CD v různých poměrech CD:ligand.**

### 3.1.2 Ligandy

Jak již bylo naznačeno, molekuly ligandů vstupujících do kavity CD musí splňovat určité nároky. V první řadě se jedná o nároky sterické, které závisí na typu použitého CD, resp. velikosti jeho kavity (obrázek 3). Již bylo zmíněno, že jednou z hlavních hybných sil procesu inkluze do kavity je hydrofobní efekt – ligand by tedy měl mít takovou strukturu, aby favorizoval hydrofobní prostředí před polárním<sup>1</sup>. Ligand může obsahovat i některé polární skupiny, které mohou být orientovány směrem ven z kavity. Tyto skupiny mohou stabilizovat komplex tvorbou vodíkových můstků s hydroxyly na okrajích kavity CD<sup>1</sup> (obrázek 5). Míra, do jaké ligandy splňují různé takové nároky, determinuje stabilitu jejich inkluzních komplexů s CD.

Na obrázku 7 jsou uvedeny příklady některých molekul tvořících komplexy  $\beta$ -CD spolu s jejich vazebnými konstantami.

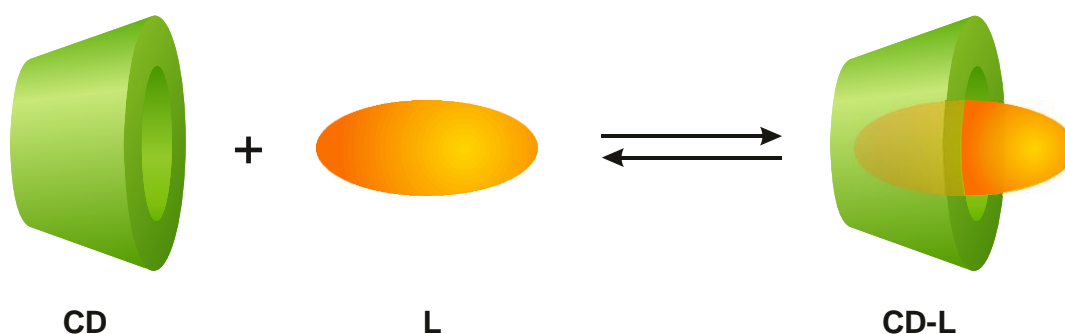


**Obrázek 7 - Struktury některých ligandů  $\beta$ -CD se zaokrouhlenými konstantami stability jejich inkluzních komplexů.<sup>21,14</sup>**

### 3.1.3 Vazebná energie

Stabilita je základní a nejdůležitější charakteristikou inkluzních komplexů a může být kvantifikována prostřednictvím vazebné konstanty  $K_b$  (také označované konstanta stability  $K_s$ , komplexační konstanta  $K_c$ , rovnovážná konstanta  $K_e$ , používána je také její převrácená hodnota – disociační konstanta  $K_d$ ).<sup>2</sup>

Inkluzní komplex není v roztoku stálý, ale jedná se o dynamickou rovnováhu mezi komplexem a volnými molekulami CD a ligandu<sup>16</sup> (schéma 1). Poměr, v jakém se obě formy v roztoku vyskytují, udává právě konstanta stability komplexu, kterou lze popsat pomocí standardních rovnic (1 – 4) používaných pro popis chemické rovnováhy.<sup>1,2</sup>



**Schéma 1 - Dynamická rovnováha systému obsahujícího molekuly CD a ligandu (L). CD-L značí inkluzní komplex těchto dvou molekul.**

$$K_b = \frac{[CD-L]}{[L][CD]}, \quad (1)$$



$$K_d = \frac{1}{K_b}, \quad (2)$$

$$\Delta G_b = -RT \ln K_b, \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (4)$$

kde  $[X]$  je rovnovážná koncentrace látky  $X$ ,  $\Delta G_b$  změna volné energie doprovázející inkluzi ligandu do CD,  $R$  je univerzální plynová konstanta,  $T$  je teplota a  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  a  $\Delta S$  jsou změny volné energie, enthalpie a entropie doprovázející libovolný proces.<sup>2</sup>

Znalost konstanty stability/vazebné konstanty inkluzních komplexů CD je klíčová pro efektivní využití toho principu v praxi.<sup>1,2</sup> Existuje více způsobů, jak tuto hodnotu experimentálně určit. Velká část těchto metod operuje s analytickým stanovením změn fyzikálně-chemických vlastností směsi ligandu s CD a analýzou jejich koncentračních závislostí. Mezi vlastnosti, které mohou být takto použity, patří především rozpustnost ve vodě,<sup>22</sup> chemická reaktivita,<sup>23</sup> optické vlastnosti,<sup>24,25,26,27,28,29,30,31,32,33</sup> NMR chemický posun,<sup>34,35,36</sup> pH systému,<sup>35</sup> změna enthalpie (kalorimetrie),<sup>37</sup> snížení bodu tání<sup>38</sup> a retenční čas při kapalinové chromatografii či kapilární elektroforéze.<sup>2,21</sup>

Kromě experimentálních metod pro určení vazebných konstant systému CD-ligand je možné tuto hodnotu získat také metodami výpočetní chemie.<sup>36,39</sup> Některé z těchto metod budou podrobněji rozebrány v kapitole 3.5.2, neboť byly pro účely této práce přímo používány.

### 3.1.4 Využití CD

Inkluze molekuly ligandu do kavity CD má výrazný vliv na její fyzikálně chemické vlastnosti, které jsou často ovlivněny velmi žádoucím způsobem. Jedná se především o zvýšení rozpustnosti špatně rozpustných látek, stabilizace labilních ligandů a jejich ochrana před oxidativní, světelnou či tepelnou degradací, snížení těkavosti látek apod. Díky tomu nalézají CD široké využití v potravinářském<sup>40</sup>, kosmetickém<sup>41</sup>, farmaceutickém<sup>42,43</sup>, chemickém<sup>44</sup> textilním průmyslu<sup>45</sup>.

Jedním z nejdůležitějších praktických využití CD je doprava léčiv do cílového místa v organismu. U většiny léčiv je požadována jistá míra rozpustnosti ve vodném prostředí, aby mohla být dopravena až k buněčné membráně. Nicméně, molekuly léčiva musí být i dostatečně lipofilní, aby mohly tuto membránu překonat. Díky inkluzi do CD je zvýšena rozpustnost kýženého léčiva a je možné ho dopravit vodným prostředím až k buňce. Hydrofobní molekula ligandu má vyšší afinitu k lipofilní membráně než molekula CD, takže při kontaktu s membránou může léčivo projít, zatímco CD díky své hydrofilicitě a velikosti zůstane ve vodném prostředí vně membrány<sup>2,42</sup>.

Tohoto principu bylo úspěšně využito pro dermální podání léčiv, roztoky pro výplach úst, nosní spreje a oční kapky.<sup>42,43</sup>

Další oblastí, ve které je bohatě využíváno vlastností CD, je kosmetický průmysl. Inkluzí molekul vonných látek do CD je možné docílit omezení těkavosti a kontrolovaného uvolňování vůně. Díky tomuto principu je možné použít CD na odstranění nepříjemných pachů (tělesný pach či nežádoucí vůně přípravků).<sup>46</sup>

Stejně jako molekuly vonných látek je možné komplexovat do CD i některé látky zprostředkující chuť, což rozšiřuje využití CD i na potravinářský průmysl. Kromě ochrany chuti a vůně potravinářských produktů jsou zde CD využívány i k vychytávání molekul cholesterolu z mléčných a vaječných produktů (díky komplexaci s CD bylo možné odstranit až 80 % cholesterolu)<sup>2,47</sup>.

V neposlední řadě je možné využít imobilizovaných molekul CD při enantioselektivních separačních metodách jako je např. HPLC, kapilární elektroforéza nebo plynová chromatografie. Derivatizované CD jsou většinou využívány jako chirální stacionární fáze, vzácněji jako aditiva mobilní fáz.<sup>48,49,50</sup> Tyto postupy byly použity na oddělení enantiomerů velkého množství racemátů organických molekul včetně mnohých léčiv.<sup>51,52,53,54,55</sup>

Již bylo zmíněno, že CD tvoří velmi ochotně inkluzní komplexy s různými aromatickými sloučeninami, z čehož plyne další možné využití – bylo například navrženo a studováno odstraňování polyaromatických uhlovodíků z vody,<sup>6</sup> půdy<sup>56</sup> či vzduchu<sup>57</sup> pomocí komplexace s CD.

V této práci se budu nicméně zabývat využitím CD ve fluorescenčních chemosenzorech. Pomocí derivatizovaných CD lze dosáhnout molekulárního rozpoznání a převést jej na měřitelný signál.<sup>24,25,26,27,28,29,30,31,32</sup> Problematika bude rozvedena v kapitole 3.3.

### 3.2 Monosubstituované deriváty CD

Díky množství hydroxylových skupin CD je možné provádět četné chemické modifikace, což otevírá široké možnosti pro jejich derivatizaci. Velká variabilita cyklodextrinových derivátů má za následek jejich stále se rozšiřující využití. Jelikož se práce týká výhradně 6-monosubstituovaných derivátů, bude zde věnována pozornost zejména jim. V závislosti na substituentu jsou tyto deriváty využitelné např. jako mimetika enzymů,<sup>2,3</sup> cílené transportéry léčiv<sup>4,5</sup> či je možné je imobilizovat na pevných površích, odkud plyne jejich další využití<sup>47,58,59,60</sup> (viz kapitola 3.3).

### 3.2.1 Strategie přípravy monosubstituovaných derivátů CD a jejich selektivní modifikace

Téměř všechny modifikace CD se odehrávají na hydroxylových skupinách, které mají nukleofilní charakter – prvotní reakcí, která povede k derivatizaci CD, je tedy elektrofilní atak. Nejpoužívanější pro tyto účely jsou silná elektrofilní činidla jako alkyl-,<sup>61</sup> silyl-,<sup>62</sup> sulfonyl-<sup>50,63,64,65,6,66,67</sup> a acylhalidy.<sup>68</sup>

Již bylo zmíněno, že CD disponují třemi různými typy hydroxylových skupin podle umístění na glukosové podjednotce – v polohách C2, C3 a C6. Každá z těchto hydroxylových skupin se trochu liší svými vlastnostmi a chemickou reaktivitou. Nejbazičtější (a většinou i nejvíc nukleofilní) jsou hydroxy-skupiny v poloze C6, zatímco C2 hydroxyly jsou nejkyselejší a tedy se i nejsnáze deprotonují. Skupiny v poloze C3 jsou nejhůře dostupné a většinou nejméně reaktivní.<sup>63</sup> Na základě těchto poznatků je možné cyclodextrinové hydroxyly selektivně modifikovat.

Dalším faktorem ovlivňujícím chování hydroxylů při modifikacích CD je možnost komplexace reagentu do kavity CD. Pokud se elektrofilní reagent inkluje do CD, je selektivita reakce determinována orientací reagentu v kavitě, pokud je komplex dostatečně rigidní.<sup>63</sup> Je třeba podotknout, že síla komplexu i orientace reagentu v kavitě je do velké míry ovlivněna použitým rozpouštědlem (např. tosylchlorid reaguje s  $\alpha$ -CD v pyridinu za vzniku 6-tosylovaného produktu, zatímco ve vodném bazickém prostředí vzniká 2-tosylovaný derivát).<sup>69</sup>

### 3.2.2 6<sup>l</sup>-O-*p*-Toluensulfonyl-cyclodextrin

Pro monosubstituce CD v poloze C6 (na primárním okraji) je nejčastěji používanou strategií převedení jednoho C6-hydroxyly na snadno odstupující sulfonylovou skupinu.<sup>50,63,64,65,6,66,67</sup> 6<sup>l</sup>-O-Sulfonáty, nejčastěji 6<sup>l</sup>-O-*p*-toluensulfonyl-cyclodextriny (tosyl-CD), jsou dobrými prekurzory 6<sup>l</sup>-deoxy-derivátů CD vznikajících nukleofilní substitucí sulfonylové skupiny (schéma 2).<sup>63</sup>

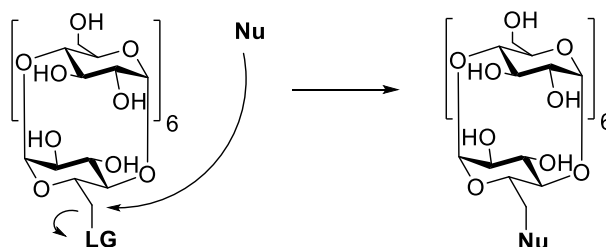


Schéma 2 - Znázornění S<sub>N</sub>2 nukleofilní substituce nukleofilem (Nu) na atomu uhlíku nesoucím dobře odstupující skupinu (LG).

Nicméně pro následnou substituci není vhodné použít silnou bázi kvůli vzniku velkého množství nežádoucího produktu – 3,6-anhydro-CD **2** (schéma 3).<sup>70</sup>

Nejčastěji volenou metodou pro přípravu nejběžnějšího tosyl- $\beta$ -CD bývá reakce *p*-toluensulfonylchloridu s  $\beta$ -CD v poměru 1:1 v alkalickém vodném prostředí. Produkt je následně čištěn opakovanou krystalizací z vody<sup>63</sup> nebo z 50% methanolu.<sup>71</sup>

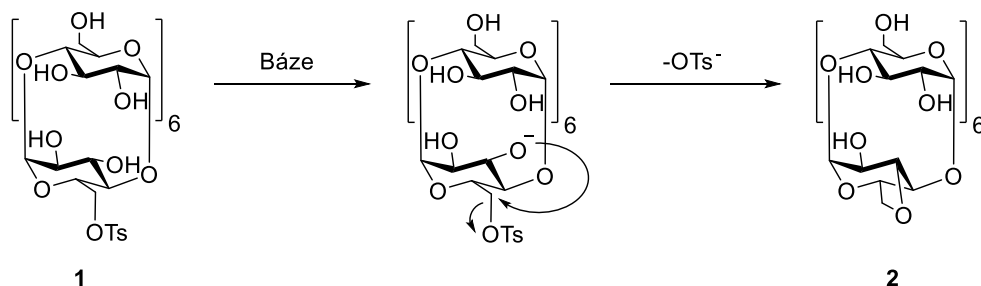
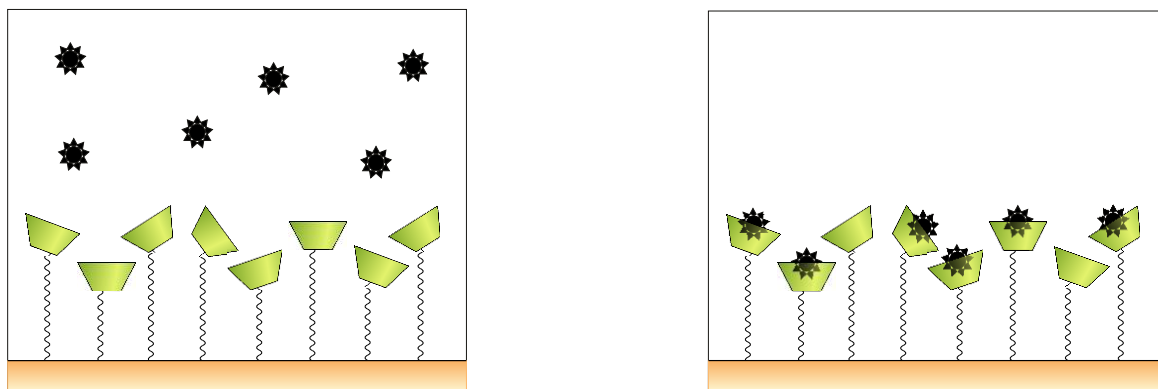


Schéma 3 - Vznik 3,6-anhydro-derivátu  $\beta$ -CD v alkalickém prostředí.

### 3.2.3 Využití monosubstituovaných CD

Monosubstituované deriváty CD nalézají široké využití – především pro přípravu enzymových mimetik<sup>3,72</sup> a imobilizaci CD na pevných površích.<sup>58,73,59,74,47,60,75,24</sup> Zmíněné umělé enzymy mohou díky nepolární kavitě CD vázat hydrofobní substráty ve vodném prostředí. Substituent na jednom z okrajů kavity může interagovat s inkludovaným substrátem a zprostředkovat požadovanou chemickou přeměnu.<sup>3</sup>

Funkcionalizované povrchy (zlato,<sup>58,73,75</sup> silikáty,<sup>60,76</sup> celulóza<sup>24</sup> apod.) jsou využívány především pro detekční<sup>47,59,60,76</sup> a separační<sup>65</sup> účely, kdy molekuly CD slouží k molekulárnímu rozpoznávání částic. Za zmínku stojí i jejich možné využití pro vychytávání molekul nežádoucích látek z roztoku, který přijde s modifikovaným povrchem do kontaktu<sup>47,6,77</sup> (obrázek 8).



Obrázek 8 - Povrch modifikovaný molekulami CD použitý pro vychytávání nežádoucích látek z roztoku.

### 3.2.4 Příprava 6<sup>I</sup>-deoxy-CD substituovaných přes atom dusíku spojkou nesoucí sulfanylovou nebo disulfidickou skupinu

Dosud bylo připraveno pouze omezené množství derivátů CD substituovaných přes aminoskupinu a obsahujících thiol či disulfidickou vazbu. Téměř všechny metody zahrnují převedení CD na tosyl-CD a následnou nukleofilní substituci aminem. 6<sup>I</sup>-((6-amino-3,4-dithiahexan-1-yl)amino)-6<sup>I</sup>-deoxy-β-CD (zkráceně β-CD-cystamin) poprvé připravili v roce 1994 Tamagaki et al.<sup>78</sup> Začali převedením tosyl-β-CD na β-CD-jodid reakcí s jodidem draselným v DMF při 80 °C. Jodid byl dále reagován s 20 molárními ekvivalenty cystaminu při 40 °C taktéž v DMF po dobu 2 dní, přičemž výtěžek tohoto kroku byl 40 %. Výsledný derivát byl redukován ethanthiolem a použit jako mimetikum enzymu glyoxalázy. Od té doby byly provedeny sporné pokusy o přípravu téhož derivátu od α-CD<sup>79</sup>, které jsou diskutovány v diplomové práci Mgr. Bednářové,<sup>80</sup> na kterou tato práce přímo navazuje. V roce 2016 údajně připravili β-CD-cystamin Li et al.,<sup>81</sup> nicméně kromě výchozích látek tosyl-β-CD a cystaminu v publikaci nespecifikovali reakční podmínky. V publikaci, která jim byla inspirací,<sup>82</sup> byl připraven analogický dusíkatý derivát 6<sup>I</sup>-((2-aminoeth-1-yl)amino)-6<sup>I</sup>-deoxy-β-CD (zkráceně ethylendiamin-β-CD) reakcí tosyl-β-CD s nadbytkem ethylendiaminu při 80 °C. Z absence jakýchkoli dalších reagentů vyplývá, že byl ethylendiamin použit i jako rozpouštědlo, což za použití cystaminu není možné (bod tání byl nalezen okolo 210 °C, tání je však doprovázeno rozkladem molekuly),<sup>83</sup> Li et al.<sup>81</sup> následně redukovali β-CD-cystamin pomocí dithiothreitolu (DTT) a výsledný derivát (β-CD-cysteamin) byl použit pro vazbu na zlaté nanočástice cílené do nádorových buněk se záměrem spustit jejich apoptózu a inhibovat další proliferaci.

Dithiothreitol, který tato skupina použila při přípravě β-CD-cysteaminu, je účinné redukční činidlo použitelné především pro redukci disulfidické vazby na thiol. Molekula DTT obsahuje dvě sulfanylové skupiny, které se oxidují reakcí s disulfidem za vzniku cyklického dithioerythriolu (DTE) (schéma 4). Oxidace DTT na DTE je favorizována díky vzniku stericky stabilizovaného šestičlenného cyklu.<sup>84</sup>

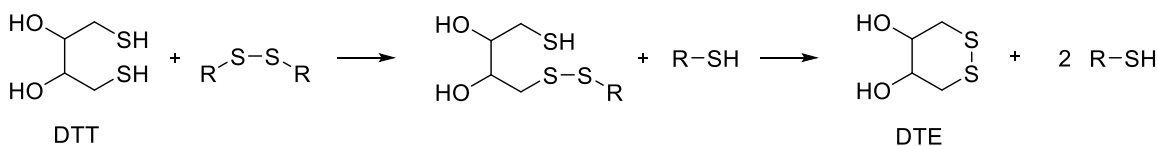


Schéma 4 - Redukce disulfidické vazby dithiothreitem.<sup>84</sup>

Velmi podobné látky byly připraveny za použití aminokyseliny L-cystinu namísto cystaminu. Liu et al. připravili nejprve dimer – tj. kongugát dvou  $\beta$ -CD přemostěných L-cystinem vázaným přes aminoskupiny v polohách C6 obou cyklodextrinů<sup>85</sup> – a později i analogický monomer, přesněji konjugát  $\beta$ -CD a L-cystinu.<sup>86</sup> Při přípravě dimeru byl tosyl- $\beta$ -CD nejprve reakcí s jodidem sodným v DMF při 90 °C převeden na  $\beta$ -CD-jodid, který byl dále reagován s vodným roztokem L-cystinu a uhličitanu sodného taktéž v DMF při 70 °C s výtěžkem 16 %.<sup>85</sup> Monomer byl připraven bez převádění na jodid, přímo z tosyl- $\beta$ -CD a L-cystinu ve směsi triethanolaminu a vody (1:1) při 95 °C. Výtěžek této reakce po přečištění pomocí iontové výměnné a následně gelové chromatografie činil 20 %<sup>86</sup>. Obě látky byly charakterizovány pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR a FT-IR, nicméně pouze u monomeru byl výsledek potvrzen hmotnostní spektrometrií.

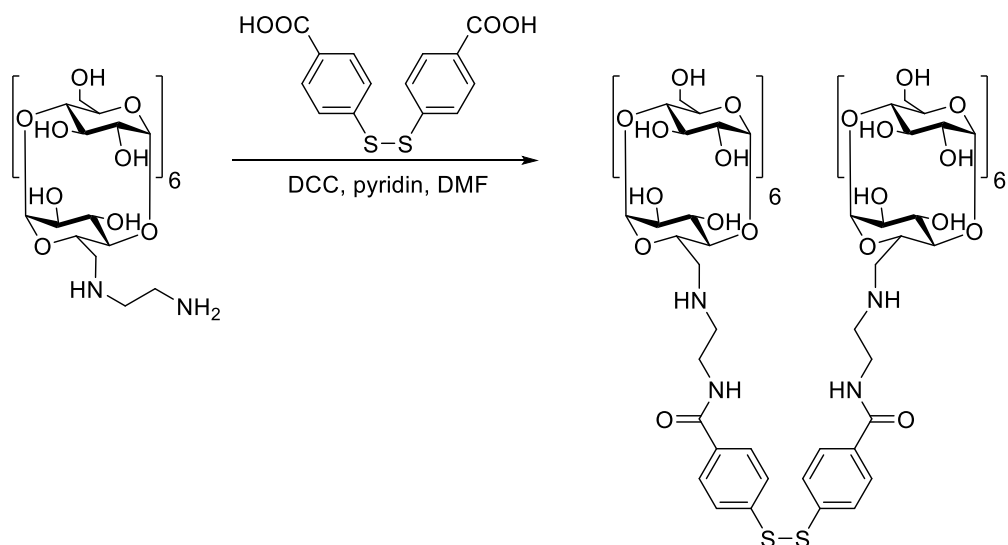
Do skupiny derivátů CD se spojkou vázanou přes aminovou skupinu a obsahující thiol či disulfid lze zařadit i látky připravené Zhangem et al.<sup>87</sup> v roce 2007. Tosyl- $\beta$ -CD převeden na ethylendiamin- $\beta$ -CD, který byl dále podroben reakci s chráněným L-cysteinem ve směsi acetonitrilu a vody za přítomnosti triethylaminu. Cystein byl takto navázán na ethylendiamin- $\beta$ -CD pomocí amidické vazby, po čemž následovalo odchránění sulfanylové a aminové skupiny.

Velmi podobnou strategii použili v roce 2016 Liu et al. při přípravě dimerů  $\beta$ -CD přemostěných pomocí disulfidické spojky odvozené od 4-merkaptobenzoové kyseliny.<sup>88</sup> Výchozí látkou zde byl taktéž ethylendiamin- $\beta$ -CD, který byl tentokrát pomocí podmínek Steglichovy reakce převeden na amid zmíněné kyseliny. Tato publikace přímo navazovala na sérii  $\beta$ -CD dimerů přemostěných spojkami obsahující aromatické jádro a disulfidickou vazbu, přičemž ve většině derivátů této série byly spojky připojeny na CD přes atom dusíku.<sup>89</sup> Ethylendiamin- $\beta$ -CD byl připraven z tosyl- $\beta$ -CD taktéž výše uvedenou reakcí a následně byl podroben reakci s vybranými alkyl- a acylchloridy a merkaptoderiváty benzoové kyseliny. Při reakcích s acylchloridy a s kyselinami byl použit dicyklohexylkarbodiimid (DCC) v DMF za přítomnosti pyridinu pro získání příslušného amidu (schéma 5).

V případě alkylchloridu byla reakce s ethylendiamin- $\beta$ -CD prováděna v DMF v přítomnosti triethylaminu při 80 °C. U výsledných derivátů byla studována kinetika a termodynamika vzniku komplexů se steroidními látkami.<sup>89</sup> Pro konjugát ethylendiamin- $\beta$ -CD s kyselinou 4-merkaptobenzoovou bylo studováno možné využití jako transportéru protinádorového léčiva Paclitaxel, nicméně ne ve formě inkluzního komplexu s CD derivátem, ale jako součást zesíťovaného supramolekulárního uskupení, uvnitř něhož mohou být molekuly Paclitaxelu uvězněny.<sup>88</sup>

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.2, CD monosubstituované lineárním řetězcem jsou použitelné pro imobilizaci na pevných površích. Pokud je derivát zakončen sulfanylovou skupinou, je možné této imobilizace dosáhnout thiol-ene<sup>90</sup> nebo thiol-yne<sup>91</sup> reakcí s povrchem nesoucím

dvojn   či trojn   vazby. Další možností je pomocí ote  v  n   epoxidů<sup>92</sup> a v neposlední řadě imobilizace sulfanylov  ch skupin na zlat  m povrchu.<sup>58,73,75</sup>



**Schéma 5 – Příprava dimeru CD přemostěného spojkou odvozenou od kyseliny 4-merkaptobenzoov  .**<sup>89</sup>

### 3.3 Chemosenzory zalo  en   na cyklodextrinech

Tato práce se zam  rjuje na přípravu derivátů CD použitelných jako součást fluorescenčních chemosenzorů. Metody zalo  en   na m  r  n   fosforescence a především fluorescence jsou velmi popul  rn   díky vysok   citlivosti a flexibilitě molekul použitelných pro vývoj takových senzorů.<sup>25</sup>

#### 3.3.1 Molekul  rn   mechanismus detekce

Naprost   v  t   ina fluorescenčních chemosenzorů funguje jedním z těchto tří mechanismů: 1) potla  en   elektronového přenosu vyvolaného z  r  n  m (PET z angl. photoinduced electron transfer) nebo zhášení fluorescence t      mi atomy (heavy-atom quenching), 2) změna vzdálenosti mezi dvěma fluoroforu ovlivňující efektivitu interchromoforn  ho energetického přenosu (interchromophore energy transfer) a 3) změna mikrookolí solvatochromního fluoroforu.<sup>93</sup>

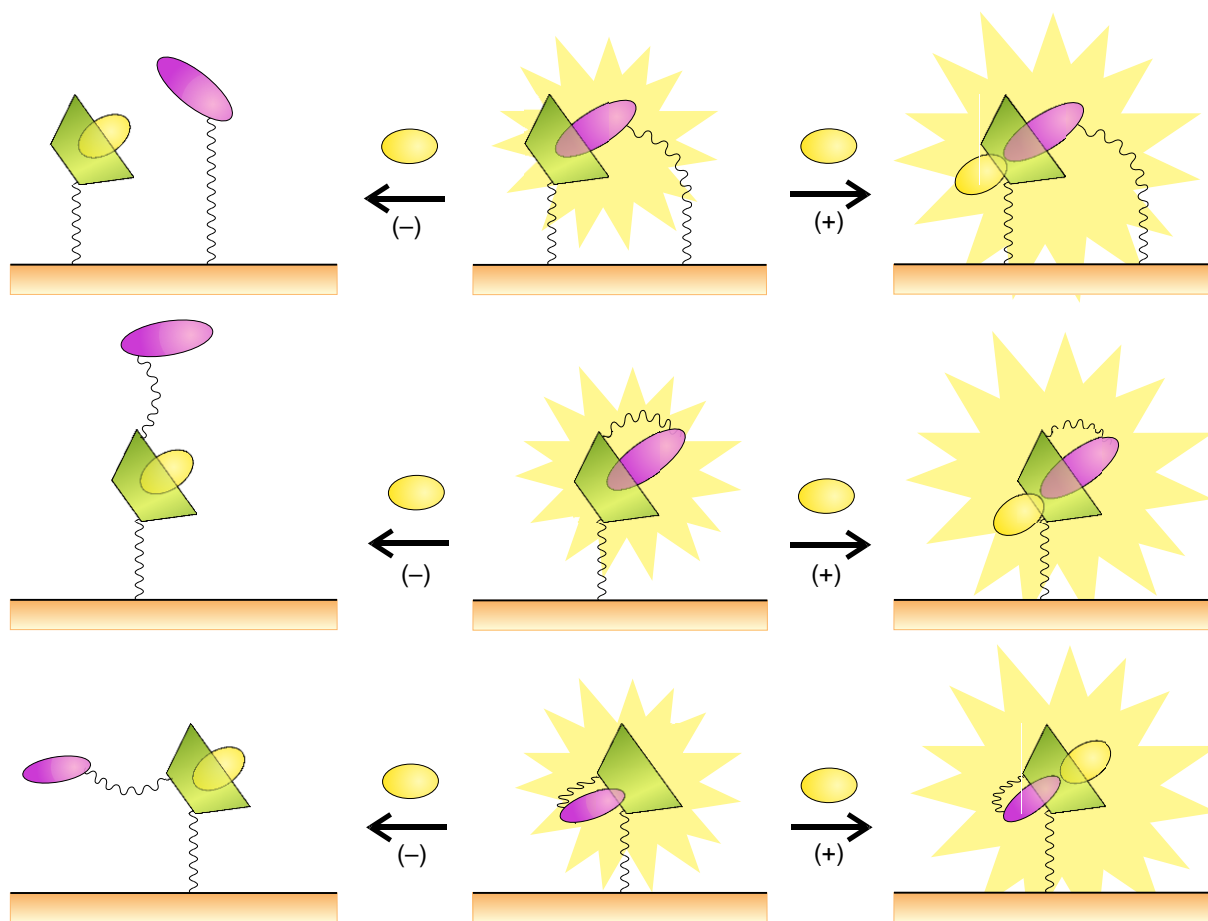
Cyklodextriny j    byly použity pro konstrukci mnoha senzorů vyu  evaj  c  ch zm  n  n   mechanismy.<sup>24,25,26,27,28,29,30,31,32,33</sup> Nicméně tato práce je zam  rjena především na poslední zm  n  n   typ – konkr  tn   systém zalo  en   na vz  jemn   imobilizovaných molekulách CD a solvatochromního fluoroforu – tedy fluoroforu, jehož spektroskopick   vlastnosti jsou ovlivněny polaritou okolního rozpou     la.<sup>94</sup>

Princip detekce takového senzoru je založen na porušení samoskladby konjugátu CD-fluorofor, přičemž obě molekuly mohou být kovalentně vázané přímo nebo mohou být imobilizovány v bezprostřední blízkosti od sebe. Bez přítomnosti analytu je v takovém systému většina molekul fluoroforu inkludována do kavit CD a systém vykazuje fluorescenci o určité intenzitě a vlnové délce. Po přidavku detekovaného analytu je – v případě jeho kompatibility s kavitou CD – změněna konformace konjugátu díky úplné nebo částečné inkluzi analytu do CD. Konformační změna způsobí změnu mikrokolí fluoroforu, což vede k měřitelné změně fluorescence systému.<sup>95</sup>

Tyto konformační změny mohou být dvojího typu: 1) fluorofor je vytěsněn analytem, což má většinou za následek snížení fluorescence nebo 2) spolu-inkluzi analytu do kavity k fluoroforu, která většinou vede ke zvýšení fluorescence<sup>7</sup> (obrázek 9).

Na základě zmíněných principů bylo úspěšně detekováno mnoho organických molekul, mezi nimi i polyaromatické uhlovodíky<sup>96</sup> a surfaktanty,<sup>97</sup> dále komplexy kovů<sup>98</sup> a ionty,<sup>29,31,99</sup> tryptofan.<sup>25</sup> Většina diskutovaných fluorescenčních senzorů je založena na použití systémů dansyl-CD<sup>27</sup>, naftyl-CD<sup>32</sup> či anthracen-CD.<sup>25</sup> Různé konjugáty typu fluorofor-CD byly použity jako environmentální chemosenzory např. pro detekci kovových iontů, DNA a organických molekul. Nicméně, většina připravených senzorických systémů nebyla imobilizována na povrchu a tedy nebyla opakovatelně použitelná.<sup>100</sup>





Obrázek 9 - Příklady uspořádání molekul CD a fluoroforu pro účely detekce. (+) značí navýšení fluorescence systému, zatímco (-) její zhášení. Fialový ovál symbolizuje fluorofor, žlutý ovál detekovaný analyt a zelený lichoběžník CD.

### 3.3.2 Solvatochromní efekt

Solvatochromismus<sup>101</sup> je ekvivalentem pro vliv rozpouštědla – nebo obecněji bezprostředního okolí molekuly – na spektroskopické vlastnosti molekuly jako např. intenzita absorpčních pásů nebo jejich vzájemný poměr.

Solvatochromní chování je způsobeno různou solvatací molekul v základním a prvním excitovaném stavu. Po excitaci molekuly pomocí světla může dojít ke změně jejího dipólového momentu. Tato změna je spojena s intramolekulárním přenosem náboje (ITC z angl. intramolecular charge transfer) z elektron-donorní části (-OMe, -NR<sub>2</sub>, alkyl) do elektron-akceptorní části molekuly (-NO<sub>2</sub>, -CO-) skrze aromatický systém (obrázek 10).

Pokud se zvyšující se polaritou rozpouštědla stabilizuje základní stav fluoroforu (tj. dipólový moment základního stavu je vyšší než dipólový moment excitovaného stavu), dochází k tzv. negativnímu solvatochromismu a absorpční spektrum vykazuje hypsochromní (modrý) posun. Naopak, když při excitaci dochází ke zvýšení dipólového momentu a excitovaný stav

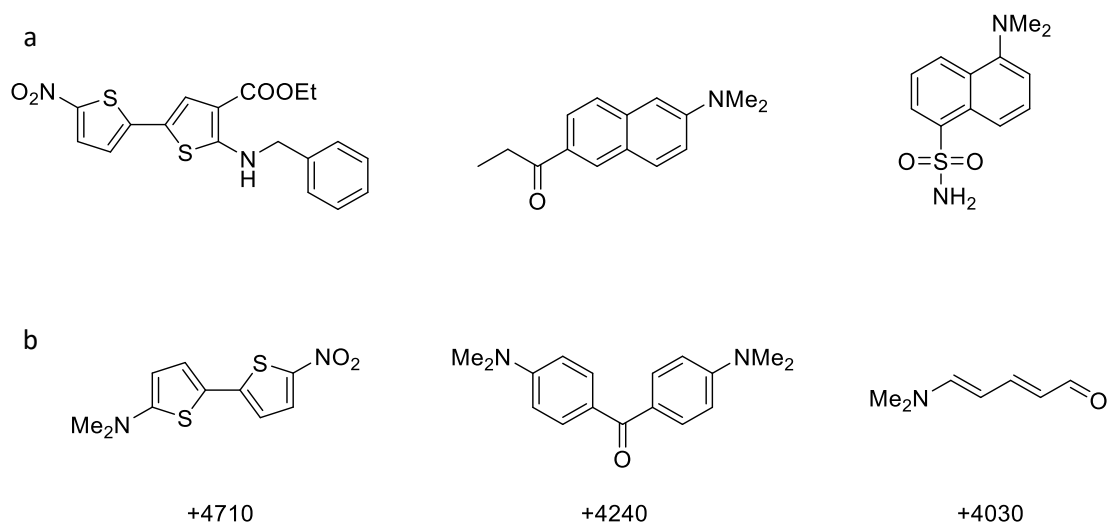
molekuly je stabilizován se zvyšující se polaritou rozpouštědla, dochází k pozitivnímu solvatochromismu, který je spojen s bathochromním (červeným) posunem.

Obecně fluorofory vykazující velkou změnu svého permanentního dipólového momentu po excitaci jsou vysoce solvatochromní. V souvislosti se změnou dipólového momentu je třeba zmínit schopnost rozpuštěné látky tvořit vodíkové můstky s okolními molekulami rozpouštědla ve svém základním a excitovaném stavu, která mnohdy určuje rozsah a znaménko solvatochromismu.<sup>101</sup>

### 3.3.3 Fluorofory

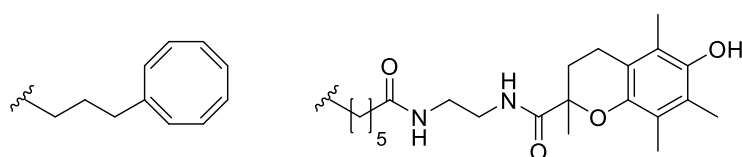
Aby mohl chemosenzor fungovat tak, jak má, musí fluorofor vybraný pro jeho konstrukci splňovat určité předpoklady. V první řadě jsou zde sterické nároky: alespoň část molekuly fluoroforu musí být schopna vstoupit do kavity CD. Nicméně vazba v inkluzním komplexu nesmí být příliš pevná, aby mohl být fluorofor vytlačen analytem<sup>28</sup> a aby mohlo dojít k požadovaným konformačním změnám, které zprostředkují detekci. Dále musí molekula fluoroforu vykazovat zmíněné solvatochromní chování a být odolná vůči tzv. photobleachingu – tedy degradaci opakovaným použitím.

Jak již bylo zmíněno, solvatochromní chování je zprostředkováno tokem elektronů z elektrondonorní do elektronakceptorní části molekuly přes konjugovaný systém. Na obrázku 10 jsou uvedeny příklady molekul, které tyto podmínky splňují a vykazují dobré solvatochromní chování.



**Obrázek 10 - a) Příklady solvatochromních fluoroforů vhodných k inkluzi do kavity  $\beta$ -CD,<sup>102,103,104,105</sup> b) příklady dalších solvatochromních fluoroforů spolu s hodnotami jejich solvatochromismu.<sup>101</sup>**

Fluorofory, které jsou opakovaně excitovány, mohou podléhat tzv. fotobleachingu neboli ztrátě svých optických vlastností opakovaným použitím. Mechanismus toho procesu popsal Blanchard et al. v publikaci pojednávající o protektivních aditivech chránících fluorofory před fotobleachingem.<sup>106</sup> Táž výzkumná skupina publikovala v roce 2012 přípravu fluoroforů s kovalentně vázanými protektivy (obrázek 11), která dočasně ochránila použitý fluorofor před ztrátou optických vlastností.<sup>107,108</sup> Fluorofory určené pro konstrukci fluorescenčních senzorů by měly být navrženy tak, aby fotobleachingu co nejméně podléhaly, což je spojeno s delší životností senzoru.



**Obrázek 11 - Struktury protektiv kovalentně vázaných na aminoskupinu fluoroforu, kterými Blanchard et al. oddálili fotobleaching studovaných molekul.**<sup>107,108,106</sup>

### 3.4 Molekulová dynamika

Metody teoretické chemie nalézají čím dál větší využití jako doplňkové metody pro studium jevů, jejichž výzkum je drahý nebo je nelze plně pokrýt dostupnými experimentálními metodami.<sup>109</sup> Mnoho z těchto metod se již stalo standardním vědeckým nástrojem.<sup>110</sup>

V rámci této práce bude studována inkluze vybraných molekul do kavity  $\beta$ -CD a pohyb syntetizovaných derivátů ve vodném roztoku pomocí molekulové dynamiky.<sup>111</sup> Při těchto dějích není porušena ani vytvořena žádná kovalentní vazba, vliv elektronů na systém je tedy možné aproximovat konstantami, protože se procesů přímo neúčastní.

#### 3.4.1 Matematický aparát programu NAMD<sup>112</sup>

Chování systému nezahrnující chemické přeměny může být aproximováno pomocí tuhých koulí spojených pružinami reprezentujícími kovalentně vázané atomy<sup>112</sup> (obrázek 12). Tento systém je vystaven působení sil, což má za následek zrychlení/zpomalení pohybu každé koule (atomu) ve směru výslednice sil na ní působících podle Newtonovy pohybové rovnice:

$$a_i(t) = \frac{F_i(t)}{m_i}, \quad (5)$$

kde  $a_i$  značí zrychlení  $i$ -tého atomu,  $i \in \{1, 2, \dots, N\}$  a  $N$  je celkový počet atomů v simulovaném systému.

Síla  $F_i$  působící na  $i$ -tý atom systému je dána derivací celkové potenciální energie  $U_{tot}$  podle polohy atomu v systému dané vektorem  $r_i$ :

$$F_i = -\nabla_{r_i} U_{tot}(r_1, r_2, \dots, r_N), \quad (6)$$

kde  $U_{tot}$  reprezentuje celkový potenciál působící na systém a je složen z jednotlivých příspěvků uvedených v rovnici (7):

$$U_{tot} = U_{bond} + U_{angle} + U_{dihed} + U_{vdW} + U_{elstat}, \quad (7)$$

kde  $U_{bond}$  vyjadřuje závislost potenciální energie na délkách vazeb mezi atomy,  $U_{angle}$  na velikosti vazebných úhlů a  $U_{dihed}$  dihedrálních úhlů.  $U_{vdW}$  představuje van der Waalovu interakci a  $U_{elstat}$  elektrostatickou interakci mezi atomy. Jednotlivé příspěvky pak lze vyjádřit pomocí rovnic (8-12):

$$U_{bond} = \sum_{i \in bonds} k_i^{bond} (d_i - d_{0i})^2, \quad (8)$$

$$U_{angle} = \sum_{i \in angles} k_i^{ang} (\theta_i - \theta_{i0})^2, \quad (9)$$

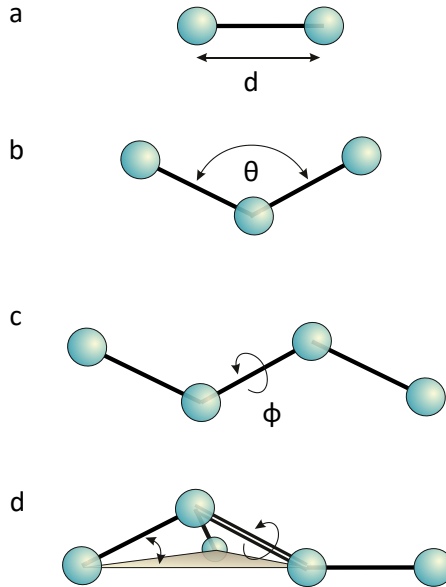
$$U_{dihed} = \sum_{i \in dih\ ang} \begin{cases} k_i^{dih} [1 + \cos(n_i \phi_i - \phi_{i0})] & n \neq 0 \\ k_i^{dih} (\phi_i - \phi_{i0})^2 & n = 0 \end{cases}, \quad (10)$$

$$U_{vdW} = \sum_{i,j=1, i < j}^N 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (11)$$

$$U_{elstat} = \sum_{i,j=1, i < j}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}}, \quad (12)$$

kde  $k_i^{bond}$ ,  $k_i^{ang}$  a  $k_i^{dih}$  jsou silové konstanty pro  $i$ -tou vazbu,  $i$ -tý úhel a  $i$ -tý dihedrální úhel,  $d_i$ ,  $\theta_i$  a  $\phi_i$  jsou aktuální hodnoty a  $d_{i0}$ ,  $\theta_{i0}$  a  $\phi_{i0}$  rovnovážné hodnoty těchto veličin,  $n$  je periodičita funkce,  $r_{ij}$  je vzdálenost atomů  $i$  a  $j$  (obrázek 12),  $\sigma_{ij}$  je meziatomová vzdálenost pro nulový Lennard-Jonesův potenciál,  $\varepsilon_{ij}$  je hloubka potenciálové jámy,  $q_i$  je náboj  $i$ -té částice a  $\varepsilon_0$  permitivita vakua.

Atomy kmitají kolem svých rovnovážných poloh a  $U_{bond}$ ,  $U_{angle}$  a  $U_{dihed}$  vyjadřují potenciály způsobené vychýlením atomu z polohy s nejnižší energií  $d_{i0}$ ,  $\theta_{i0}$ , resp.  $\phi_{i0}$ .<sup>112</sup>



**Obrázek 12 - Parametry systému tuhých koulí, kterými je aproximována molekula v MD. Pro simulaci takového systému je potřeba znát a) rovnovážnou délku vazby mezi atomy, b) vazebný úhel, c) torzní úhel a d) torzní úhel označovaný "improper", který zajišťuje planaritu konjugovaného systému.<sup>112</sup>**

Simulace je složena z krátkých časových kroků, přičemž během každého kroku se atomy pohnou na základě síly vypočtené z uvedených potenciálů (rovnice 5). Jelikož se tím změní výchylky atomů z jejich rovnovážných poloh, musí být znovu vypočtena síla, která způsobí pohyb atomů v dalším časovém kroku. Každý další krok je generován pomocí Verletova algoritmu, který je možné vyjádřit rovnicemi (13 – 16):

$$v_{i+1/2} = v_i + M^{-1}F_i \frac{\Delta t}{2}, \quad (13)$$

$$r_{i+1} = r_i + v_{i+1/2}\Delta t, \quad (14)$$

$$F_{i+1} = F(r_{i+1}), \quad (15)$$

$$v_{i+1} = v_{i+1/2} + M^{-1}F_{i+1} \frac{\Delta t}{2}, \quad (16)$$

kde  $v_i$  je rychlost  $i$ -té částice a  $M$  hmotnost.

Kontrola teploty je zprostředkována Langevinovou dynamikou a kontrola tlaku Langevin-Hooverovou dynamikou.<sup>112</sup>

### 3.4.2 Výpočet relativní vazebné energie $\Delta G_{b,rel}$

Již bylo zmíněno, že vazebná konstanta  $K_b$  a potažmo vazebná energie  $\Delta G_b$  jsou stěžejními veličinami, podle kterých je možné předvídat chování studovaného supramolekulárního systému. Vazebnou energii  $\Delta G_b$  lze získat z celkového potenciálu  $U_{tot}$  pomocí vztahů (17) a (18):

$$G(N, p, T) = -\frac{1}{\beta} \ln \int_0^\infty Q(N, V, T) e^{-\beta pV} dV, \quad (17)$$

$$Q(N, V, T) = \int e^{-\beta \left( \sum_{i=0}^N \frac{p_i^2}{2m_i} \right)} dp^N \int e^{-\beta \left( \sum_{i=0}^N U_{tot}(r_1, r_2, \dots, r_N) \right)} dr^N, \quad (18)$$

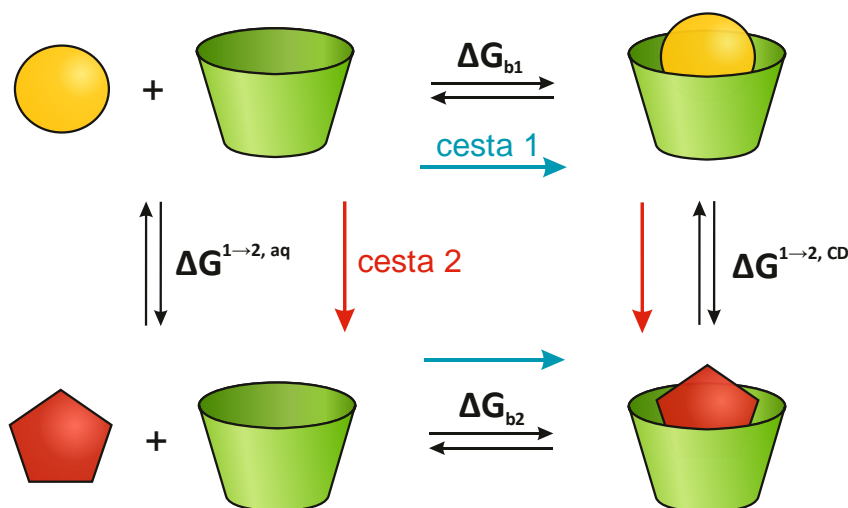
kde  $Q(N, V, T)$  je partiční funkce,  $\beta = \frac{1}{k_B T}$  a  $k_B$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  termodynamická teplota,  $p_i$  je hybnost  $i$ -té částice,  $p$  je tlak a  $V$  objem simulovaného systému.

Pro naše účely se kromě vazebné energie bude hodit rozdíl této veličiny pro dva různé ligandy, který zde bude označován jako relativní vazebná energie  $\Delta G_{b,rel}$ . Její znalost umožní seřadit ligandy podle afinity ke kavitě CD a lze ji získat prostřednictvím vztahu (19):

$$\Delta G_{b,rel}^{1-2} = RT \ln \frac{K_{b1}}{K_{b2}}, \quad (19)$$

kde  $\Delta G_{b,rel}^{1-2}$  je rozdíl vazebných energií ligandů 1 a 2,  $K_{b1}$  a  $K_{b2}$  jsou vazebné konstanty ligandů 1 a 2.<sup>113</sup>

Hodnotu relativní vazebné energie lze získat pomocí MD simulací na základě vztahů (17) a (18). Pro tyto účely je možné použít geometrickou transformaci (cesta 1, schéma 6), tedy vytahování ligandu z kavity, což představuje velký zásah do systému, který je doprovázen vysokou výpočetní náročností. Nebo je možné zvolit alchymistickou transformaci (cesta 2, Schéma 6 6), tedy přeměnu jednoho ligandu ve druhý, která sice představuje nefyzikální proces, ale díky své menší výpočetní náročnosti se těší velké oblibě.<sup>114</sup>



**Schéma 6 – Termodynamický cyklus znázorňující dva možné výpočty relativních vazebných energií.**

Díky skutečnosti, že je volná energie stavovou funkcí, lze získat oběma způsoby stejný výsledek. Hodnota stavové funkce závisí pouze na stavu systému a nikoli na cestě, jakou do stavu systém dospěl a tedy platí:

$$\Delta G_{b1} - \Delta G_{b2} = \Delta G^{1 \rightarrow 2, aq} - \Delta G^{1 \rightarrow 2, CD} = \Delta G_{b,rel}^{1-2}, \quad (20)$$

kde  $\Delta G_{b,1}$  a  $\Delta G_{b,2}$  jsou vazebné energie ligandů 1 a 2,  $\Delta G^{1 \rightarrow 2, aq}$  je volná energie spojená s procesem vzájemné přeměny ligandů 1 a 2 pouze ve vodní obálce a  $\Delta G^{1 \rightarrow 2, CD}$  vyjadřuje tutéž hodnotu pro ligandy v kavitě CD.

Aby nedocházelo během simulace k příliš velkému zásahu do systému, musí být přeměna ligandů zprostředkována dostatečně malými dílčími kroky, se kterými ubývají příspěvky silových konstant jednoho ligandu a přibývají příspěvky druhého (schéma 7). Každý takový krok představuje vychýlení systému z rovnováhy (perturbaci), podle kterého je metoda pojmenovaná (FEP, z angl. Free Energy Perturbation). Velikost takového dílčího kroku zde bude označována koeficientem  $\lambda$ .<sup>115</sup>

Alchymistické metody byly úspěšně použity pro studium cyklodextrinových komplexů, např. se steroidními hormony,<sup>116</sup> fulereny<sup>117</sup> či některými léčivy.<sup>118</sup>



**Schéma 7 - Molekula ligandu musí podléhat přeměně/mizení s co nejmenším krokem, aby bylo dosaženo reverzibilního chování systému.**

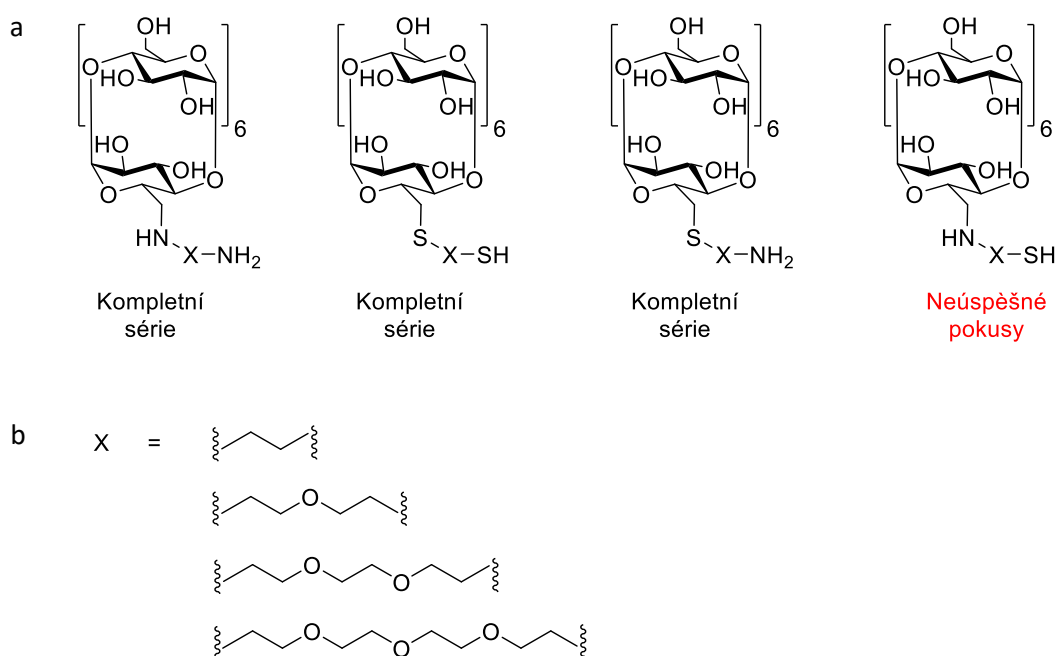


## 4 Výsledky a diskuse

Kvůli víceborové povaze práce použitých pro vypracování práce bude pojednáváno zvlášť o syntetických metodách a zvlášť o metodách výpočetních. Nejprve se budu věnovat syntetické části této práce.

### 4.1 Syntéza

Cílem práce bylo dokončit sérii látek, kterou začala Mgr. Eva Bednářová ve své diplomové práci.<sup>80,119</sup> Jedná se o 6<sup>I</sup>-monosubstituované deriváty  $\beta$ -CD (obrázek 13a), kde byl substituentem různě dlouhý linker připojený přes síru nebo přes dusík. V rámci této práce bude používáno zjednodušené označení pro různě dlouhé spojky vázané na CD, jak je znázorněno na obrázku 13b.

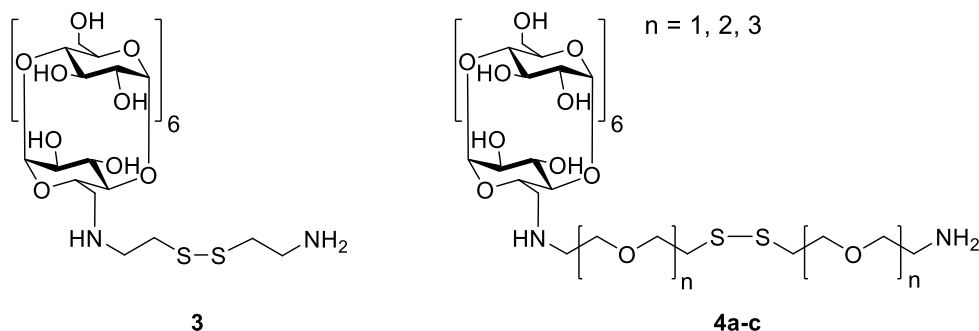


**Obrázek 13 – a) Struktury látek série, ve které pokračuje tato práce. Značka X znamená ethylen, diethylenglykol, triethylenglykol nebo tetraethylenglykol, b) zjednodušující označení různě dlouhých řetězců, které byly součástí všech cílových derivátů série.**

Cílem práce tedy bylo připravit deriváty  $\beta$ -CD se spojkou připojenou přes dusík a zakončenou sulfanylovou skupinou ( $\beta$ -CD-N-X-SH). Bednářová ve své práci diskutuje problematičnost přípravy těchto derivátů, kvůli které nebyla v její diplomové práci série dokončena.<sup>80</sup>

Jedním z problémů byla reaktivita sulfanylové skupiny. Substituce tosyly sulfanylovou skupinou totiž probíhala mnohonásobně rychleji než analogická reakce s aminem. Dalším

problémem byla snadná oxidace této skupiny na disulfid – jakýkoli produkt byl po kontaktu se vzduchem okamžitě kontaminován produktem oxidace. Strategie přípravy těchto derivátů nakonec bylo tohoto chování sulfanylu využít a připravit nejprve prekursor této látky, kde bude spojka v disulfidické formě (obrázek 14). Právě na přípravu těchto prekursorů bude zaměřena syntetická část práce.

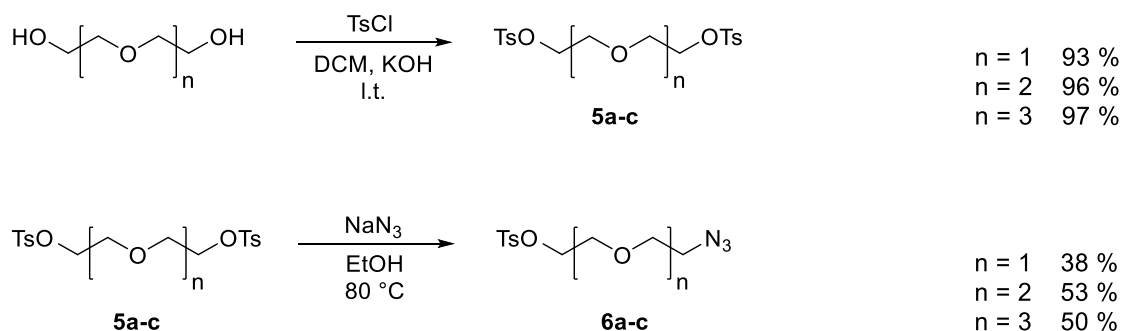


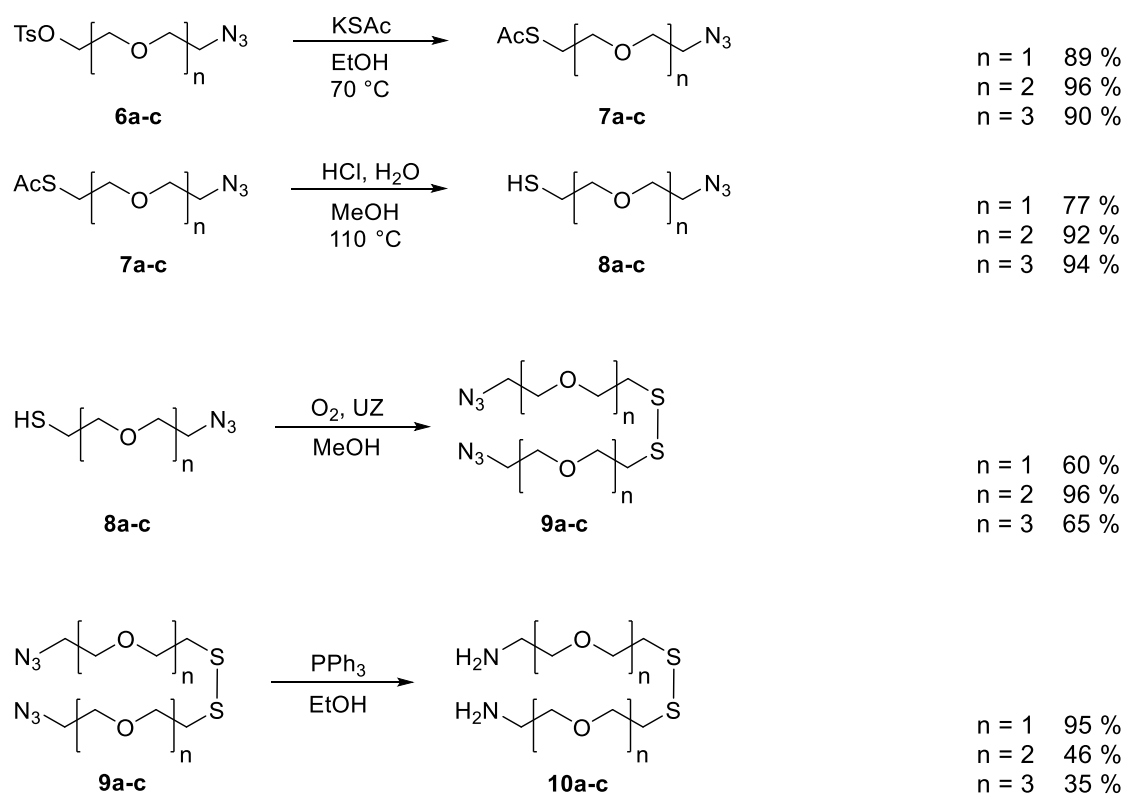
**Obrázek 14 - Struktury cílových látek této práce:  $\beta$ -CD-cystaminu (3) a  $\beta$ -CD-NH-X-S-S-X-NH<sub>2</sub> (4a-c).**

#### 4.1.1 Oligoethylenglykolové spojky

Z důvodu přímé návaznosti na práci Bednářové byly pro přípravu spojek určených k vazbě na molekulu  $\beta$ -CD použity obdobné strategie. Postup přípravy oligoethylenglykolových spojek inspirovaný prací Bednářové je spolu s výtěžky znázorněn na schématu 8.

Pro oxidaci azido-thiolů **8a-c** byla metoda upravena, což vedlo ke snížení její časové náročnosti. Na základě postupu publikovaného v literatuře<sup>120</sup> bylo zjištěno, že na oxidaci takto reaktivní látky stačí kyslík rozpuštěný v nedegazovaném methanolu a vystavení ultrazvuku na 30 inut, není tedy potřeba směs týden probublávat vzduchem, jak tomu bylo v původním postupu.<sup>80</sup>



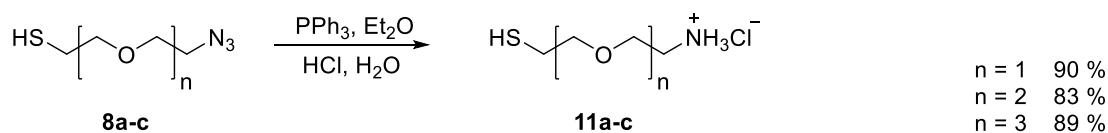


**Schéma 8 - Reakční schémata znázorňující přípravu oligoethylenových spojek určených pro vazbu na  $\beta$ -CD .**

Již bylo zmíněno, že práce s thioley je komplikována jejich ochotou oxidovat se na disulfid, což je umocněno v bazickém prostředí, které je u cílových derivátů (obrázek 13) zprostředkováno přítomností aminoskupiny.

Pro vyšetření chování látek obsahujících aminovou a sulfanylovou skupinu byla úspěšně vyzkoušena ještě další strategie přípravy prekurzorů ambidentních spojek **10a-c**. Cílem bylo v průběhu přípravy izolovat látku obsahující tyto dvě funkční skupiny ve formě hydrochloridu, aby byla zpomalena oxidace jejich sulfanylových skupin (schéma 9).

Pro redukci azidové skupiny byla použita taktéž Staudingerova reakce, na rozdíl od původní strategie však byly nastoleny dvoufázové reakční podmínky. V etherickém roztoku trifenyfosfinu proběhla redukce azidu na amin, který byl ihned po kontaktu s kyselým vodným prostředím protonován. Takto nabitá molekula ochotně přešla do vodné fáze, která díky silně kyselému prostředí (1 M HCl) stabilizovala sulfanylovou skupinu v neoxidovaném stavu. Tato strategie byla inspirována postupem optimalizovaným Bc. Hadzimou<sup>121</sup> a poskytla velmi dobré výtěžky (schéma 9).

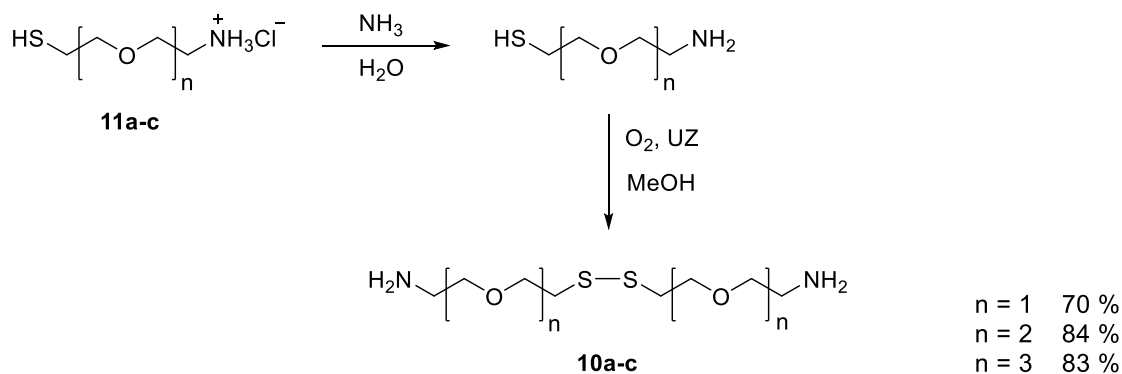


**Schéma 9 - Příprava sulfanyl-oligoethylenglykol-amonium chloridu (8a-c) za použití Staudingerovy redukce azido-thiolu (11a-c) v dvoufázové soustavě.**

Je překvapivé, že pro přípravu oligoethylenglykolových derivátů zakončených amino a sulfanylovou skupinou existuje velmi málo literatury. Tetraethylenglykolový derivát byl připraven pouze v čínském patentu (CN 101525342) a v práci, na kterou je zde navázáno.<sup>80</sup> Triethylenglykolový derivát byl připraven v rámci publikace Mrkische et al.<sup>122</sup> v roce 2005 a pro diethylenglykolový derivát nebyla nalezena žádná literatura zmiňující jeho přípravu.

Při přípravě hydrochloridů **11a-c** byla zpracována pouze vodná fáze, která obsahovala produkt, proto nebylo potřeba oddělovat ho od trifenylofosfinoxidu, který se vysrážel a zůstal především ve fázi organické. Po extrakci chloroformem a odpaření vody nebyly na NMR zaznamenány žádné stopy trifenylofosfinoxidu a proto směs nepotřebovala zdlouhavé čištění na katexu, které bylo použito při redukci derivátů **9a-c** v jedné fázi.

Pro přípravu výchozí látky použité k vazbě na  $\beta$ -CD byl hydrochlorid **11a-c** deprotonován amoniakem a oxidován výše popsaným postupem za pomoci ultrazvuku (schéma 10).

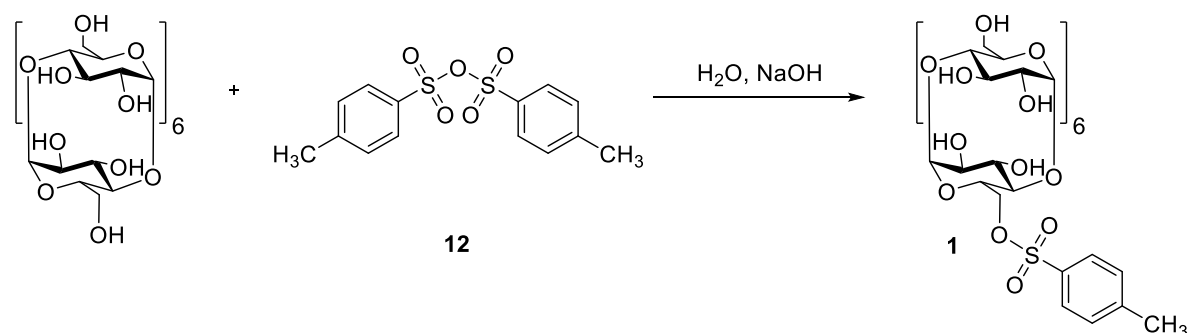


**Schéma 10 - Oxidace sulfanyl-amonium chloridů (11a-c) na disulfidy (10a-c).**

#### 4.1.2 6'-((6-Amino-3,4-dithiahexan-1-yl)amino)-6'-deoxy- $\beta$ -cyklodextrin

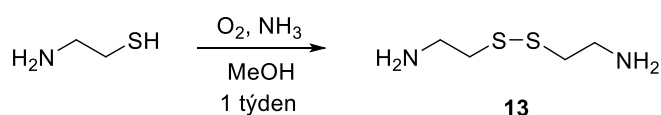
##### 4.1.2.1 Příprava

Přestože je podle literatury nejčastěji používanou přípravou monotosyl- $\beta$ -CD reakce  $\beta$ -CD s *p*-toluensulfonylchloridem (viz. kapitola 3.2), pro tento krok byl použit postup, který se v naší laboratoři více osvědčil<sup>80</sup> (schéma 11).



**Schéma 11 - Příprava tosyl- $\beta$ -CD reakcí nativního  $\beta$ -CD s *p*-toluensulfonylanhydridem v alkalickém prostředí.**

Pro optimalizaci přípravy derivátů  $\beta$ -CD-(N-X-S)<sub>2</sub> byl zvolen  $\beta$ -CD-cystamin (3), jehož výchozí látka cystamin nevyžaduje mnohakrokovou syntézu, jako je tomu u oligoethylenglykolových spojek. Cystamin byl připraven oxidací vzdušným kyslíkem v amoniakálním prostředí po dobu jednoho týdne<sup>80</sup> (schéma 12). Pro zavzdušnění roztoku bylo použito probublávání akvarijním motorkem.



**Schéma 12 - Oxidace cysteaminu na cystamin (13) vzdušným kyslíkem.**

Jedním z důvodů, proč byla příprava cílových látek  $\beta$ -CD-(N-X-S)<sub>2</sub> problematická, byla tvorba více produktů při použití reakčních podmínek vyhovujících přípravě některých dalších látek ze série. Tyto produkty byly velmi špatně rozlišitelné pomocí TLC a nebylo je možné separovat pomocí sloupové chromatografie<sup>80</sup>.

#### 4.1.2.2 Optimalizace reakčních podmínek

Pro přípravu cílových produktů byla zvolena následující strategie:

- 1) Nejprve byla provedena reakce za dříve navržených podmínek<sup>80</sup> (schéma 13) a optimalizována eluční soustava pro TLC, díky které byly jednotlivé produkty dobře rozlišitelné.
- 2) Díky tomu, že se povedlo sloupcovou chromatografií separovat stopové množství produktu (většina frakcí byla směsná), byla pomocí hmotnostní spektrometrie identifikována stopa na TLC, která odpovídala žádanému produktu **3**.
- 3) Následně byla prováděna optimalizace reakčních podmínek za použití TLC.
- 4) Během hledání vhodných reakčních podmínek byla optimalizována také separace reakční směsi pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu.

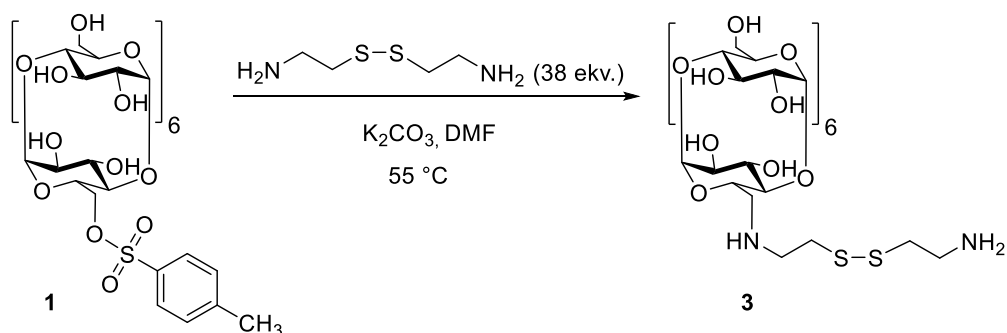
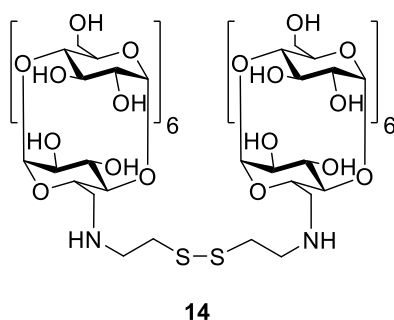


Schéma 13 - Reakční podmínky pro přípravu derivátu **3** navržené v literatuře.<sup>80</sup>

Pro nalezení optimálních podmínek byl proveden screening ve smyslu použitého rozpouštědla, typu a množství báze a poměru výchozích látek. Podle porovnání intenzity stop na TLC (tato intenzita je dobře porovnatelná při detekci 50 % kyselinou sírovou a při zvolení optimální koncentrace nanesené na TLC) bylo zjištěno, že nejlepším rozpouštědlem pro tuto reakci je DMSO. Při vyšetřování počtu ekvivalentů cystaminu potřebných pro získání produktu **3** bylo původních 38 ekv. sníženo na 5 ekv. Nicméně v obou případech vznikala stejnou měrou jako žádaný produkt **3** jeden z vedlejších produktů. Později bylo pomocí hmotnostní spektrometrie zjištěno, že má tento vedlejší produkt relativní molekulovou hmotnost 1313,4 (dále zde bude označován jako BP-1313).

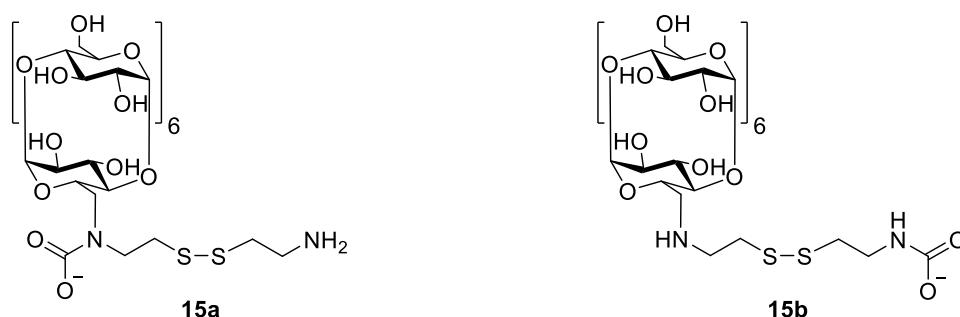
#### 4.1.2.3 Vedlejší produkty

Zajímavé je, že při nadbytku tosyl- $\beta$ -CD nad cystaminem (2:1) nevzniká dimer **14** (dva  $\beta$ -CD přemostěné cystaminovou spojkou – obrázek 15), jak bylo původně očekáváno. Na základě hmotnostní spektrometrie bylo později zjištěno, že produktem reakce při tomto poměru výchozích látek je pravděpodobně směs 3,6-anhydro- $\beta$ -CD (**2**) a nativního  $\beta$ -CD (schéma 3).



**Obrázek 15 - Mylně předpokládaný hlavní produkt reakce tosyl- $\beta$ -CD a cystaminu při nadbytku tosyl-  $\beta$ -CD.**

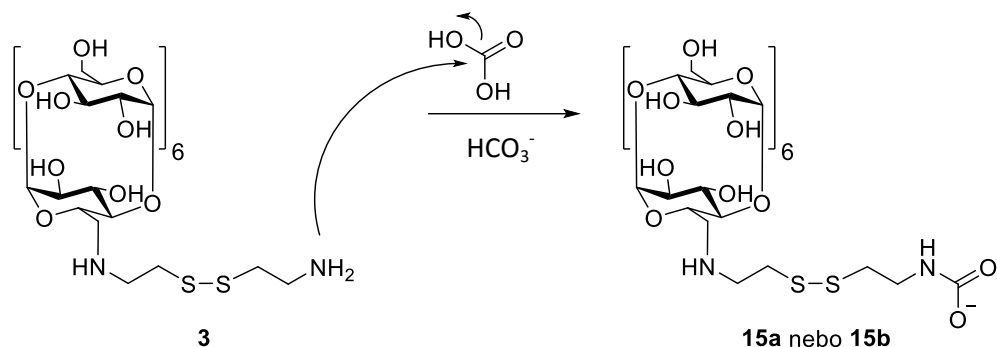
Dále jsme se zaměřili na zmíněný vedlejší produkt BP-1313. Navrhli jsme hypotézu, podle které by se mohlo jednat o karbamovou kyselinu odvozenou od  $\beta$ -CD-cystaminu (obrázek 16). Vznik této látky by byl způsoben přítomností uhličitanu, což by dobře korelovalo se studiemi Ita et al., kteří zkoumali kinetiku vzniku a rozkladu karbamátů, které byly připraveny reakcí aminokyselin s uhličitane draselným ve vodném prostředí. Podle jejich publikace jsou vzniklé karbamáty nečekaně stabilní látky s dlouhým poločasem rozkladu.<sup>123</sup>



**Obrázek 16 - Předpokládané vedlejší produkty přípravy  $\beta$ -CD-cystaminu (3) v přítomnosti uhličitanu. hypotézou je, že se jedná o karbamové kyseliny 15a nebo 15b odvozené od  $\beta$ -CD-cystaminu (3).**

Podle Ita et al. závisí vznik karbamátu na pH reakční směsi. Je totiž potřeba dostatečná koncentrace plně protonované kyseliny uhličitě, aby mohlo dojít k nukleofilnímu ataku na jejím karbonylovém uhlíku<sup>123</sup> (schéma 14).

Pro vyšetření zmíněné hypotézy byla provedena série reakcí s různou koncentrací uhličitanu draselného v reakční směsi. Intenzita stopy BP-1313 na TLC byla úměrná množství přidaného uhličitanu, což napovídá ve prospěch této hypotézy. Bohužel se ale nepodařilo oddělit dostatečné množství tohoto vedlejšího produktu pro naměření NMR spekter.

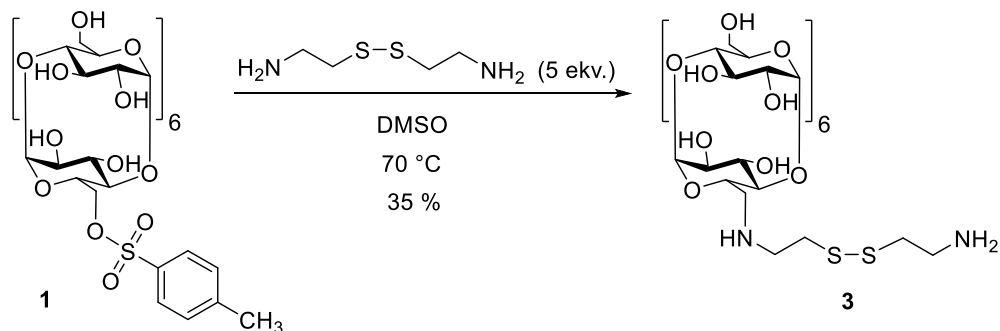


**Schéma 14 - Navržený mechanismus vzniku karbamových kyselin 15a a 15b (pro jednoduchost je uvedena pouze 15a).**

Ve prospěch hypotézy také napovídá zanedbatelný vznik produktu BP-1313 při nulovém přídavku uhličitanu. Při těchto podmínkách byla naopak zaznamenána vyšší intenzita TLC-stopů žadaného produktu **3**. Od použití uhličitanu jako báze bylo na základě tohoto zjištění upuštěno. Samotný výchozí cystamin má charakter báze, takže byl zahrnut do screeningu bází jako jedna z možností a zároveň jako blank. Podle TLC vznikalo bez použití přidané báze největší množství žadaného produktu - β-CD-cystaminu (**3**).

Absence přidané báze však měla za následek prodloužení reakčního času – plné konverze tosyl-β-CD bylo dosaženo až po 72 hodinách. Tato doba však byla úspěšně zkrácena na 24 hodin zvýšením teploty na 70 °C bez výrazného ovlivnění vzájemné intenzity TLC stop.

Výsledné reakční podmínky po optimalizaci jsou zobrazeny na schématu 15 a poskytly výtěžek 35 %.

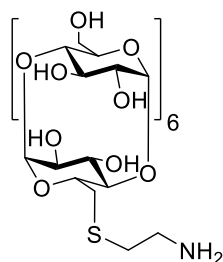


**Schéma 15 - Reakční podmínky pro přípravu β-CD-cystaminu (3) po optimalizaci.**

Při této reakci byl pozorován i vznik malého množství derivátu o relativní molekulové hmotnosti 1193,4. Tato hmotnost odpovídá redukované formě derivátu **3** nebo látce se stejným linkerem, ale připojeným přes síru (**16**, obrázek 17). Podle literatury<sup>80</sup> jsou však deriváty zakončené thiolovou skupinou velmi nestabilní, zdá se tedy pravděpodobnější, že jde o derivát **16**.



K jeho vzniku mohlo dojít nejspíš kvůli disproportionaci disulfidů v bazickém prostředí,<sup>124</sup> díky které se vyskytlo v reakční směsi malé množství spojky v monomerní formě.



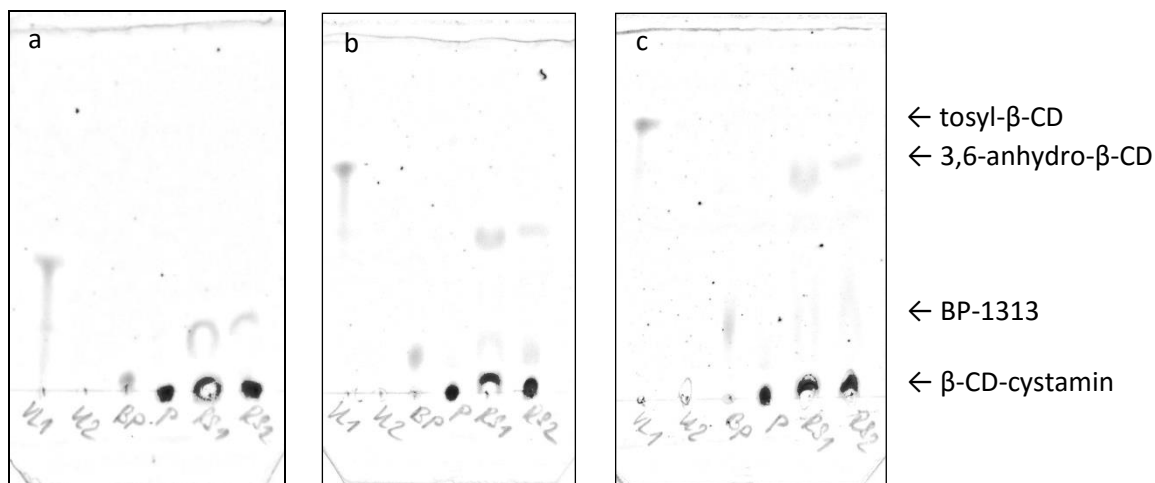
16

**Obrázek 17 – Pravděpodobný vedlejší produkt nalezený pomocí hmotnostní spektrometrie, který pravděpodobně vznikl disproportionací cystaminu (13) a jeho následnou reakcí s tosyl- $\beta$ -CD (1).**

#### 4.1.2.4 Separace

Jak již bylo zmíněno, reakční směs při přípravě  $\beta$ -CD-cystaminu bylo velmi obtížné separovat na jednotlivé složky směsi. Proto musela být tato separační metoda také optimalizována. Pomocí TLC byly nalezeny vhodné soustavy, kterými jsou postupně eluovány jednotlivé složky reakční směsi. Všechny tyto soustavy jsou složeny z butanolu (BuOH), ethanolu (EtOH) a vody ( $H_2O$ ), případně s přidavkem kyseliny octové (HOAc). První soustava je směsí BuOH/EtOH/ $H_2O$  v poměru 5/2/2, která eluuje nejméně polární složky reakční směsi (3,6-anhydro- $\beta$ -CD, případně stopy tosyl- $\beta$ -CD a  $\beta$ -CD). Stopy BP-1313 jsou eluovány toutéž soustavou v poměru 5/4/4, zatímco výsledný produkt je možné eluovat touto soustavou v poměru 5/8/6 (obrázek 18). Vymývání produktu poslední zmíněnou soustavou je ale velmi pomalé. Bylo zjištěno, že k výraznému urychlení dojde při přidání 0,5 objemového ekvivalentu 25 % HOAc.

Výsledná separační strategie zahrnuje použití stupňovitého gradientu zmíněných soustav v pořadí, v jakém byly uvedeny.



Obrázek 18 - TLC optimalizace eluční soustavy (BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O): a) 5/2/2, b) 5/4/4, c) 5/8/6.

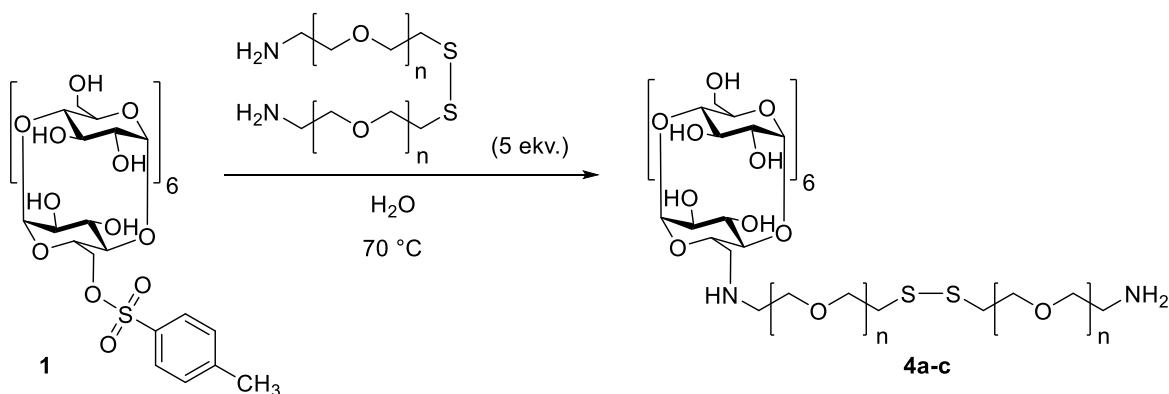
### 4.1.3 β-CD-NH-OEG-S-S-OEG-NH<sub>2</sub> (4a-c)

#### 4.1.3.1 Příprava

Pro přípravu ostatních derivátů typu β-CD-NH-X-S-S-X-NH<sub>2</sub> byly použity reakční podmínky optimalizované výše uvedeným postupem. Protože byla při přípravě β-CD-cystaminu druhým nejlepším rozpouštědlem voda, byl proveden minimalistický screening rozpouštědel pro přípravu oligoethylenglykolových derivátů, ve kterém byla srovnána voda a DMSO (Tabulka 1).

Navzdory očekávání, podle kterého by měl DMSO podporovat S<sub>N</sub>2 substituci na rozdíl od vody, byla voda pro tuto reakci lepším rozpouštědlem. Přestože při reakci ve vodném prostředí byl porozován vyšší výtěžek, byla zde reakce pomalejší. Tato skutečnost byla zjištěna až po separaci směsi, kdy bylo izolováno i malé množství výchozího tosyl-β-CD (na TLC nebyl téměř pozorovatelný), zatímco po reakci v DMSO nikoliv.

Možným vysvětlením vyšší výtěžnosti ve vodě by mohla být vyšší afinita nepolární spojky ke kavitě β-CD ve vodném prostředí než v DMSO. Což by ovšem nemělo platit pro cystamin, pokud je tato hypotéza správná. Pro tyto účely byl přezkoumán rozdělovací poměr mezi vodou a chloroformem pro všechny použité spojky. Bylo zjištěno, že zatímco téměř všechny cystamin (**3**) zůstává ve vodě, větší část sloučenin **9a-c** přechází do chloroformu. Díky lipofilitě svého řetězce by se tedy molekuly spojek mohly ve vodném prostředí komplexovat do kavity tosyl-β-CD a dát tak prostor požadované nukleofilní substituci. Optimální podmínky pro přípravu cílových derivátů jsou znázorněny na schéma 16.



**Schéma 16 – Optimalizované reakční podmínky pro přípravu cyclodextrinových derivátů 4a-c.**

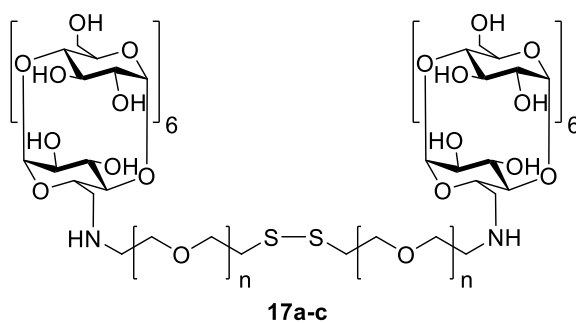
**Tabulka 1 – Porovnání výtěžnosti přípravy látek 4a-c v DMSO a ve vodě.**

Označení připravované sloučeniny	Rozpouštědlo	Výtěžek reakce
<b>4a</b>	DMSO	29 %
<b>4a</b>	H <sub>2</sub> O	65 %
<b>4b</b>	DMSO	33 %
<b>4b</b>	H <sub>2</sub> O	64 %
<b>4c</b>	DMSO	75 %
<b>4c</b>	H <sub>2</sub> O	88 %

Reakční směsi byly separovány stejnou strategií, která byla optimalizována pro β-CD-cystamin. Na rozdíl od něj se však cílové deriváty soustavou 5/8/6 nevymývají a přidavek kyseliny octové pro jejich eluci je nezbytný.

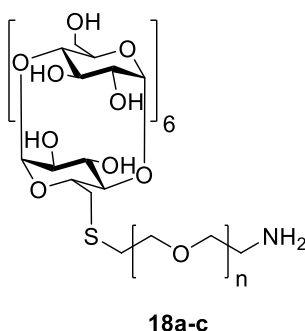
#### 4.1.3.2 Vedlejší produkty

Zajímavostí je, že se soustava 5/8/6 eluuje vedlejší produkt, který má na TLC R<sub>f</sub> totožné v cílovou látkou (**4a-c**). Na základě hmotnostního spektra bylo ale zjištěno, že jde o zmíněný přemostěný dimer (obrázek 19), který při těchto podmínkách za použití cystaminu nevzniká a nebyl tedy brán v potaz. Nicméně tento produkt by mohl být ještě lepším prekurzorem pro přípravu thiolů β-CD-NH-X-SH, neboť by zde nebylo zapotřebí separovat produkt redukce od volného linkeru.



**Obrázek 19 - Vedlejší produkt vznikající v malém množství při přípravě derivátů 4a-c.**

Při všech třech reakcích (pro  $n = 1, 2, 3$ ; schéma 16) bylo izolováno také velmi malé množství vedlejšího produktu se spojkou vázanou přes síru (obrázek 20). Vznik tohoto derivátu byl nejspíš zapříčiněn disproportionací disulfidů v bazickém prostředí a výraznou nukleofilitou sulfanylové skupiny, stejně jako u reakce s cystaminem.<sup>124</sup>



**Obrázek 20 – Pravděpodobný vedlejší produkt vznikající při přípravě látek 4a-c vznikající díky disproportionaci výchozích disulfidů 10a-c.**

Je možné, že mezi nejméně polárními vedlejšími produkty eluovanými soustavou 5/2/2 byl také 3,6-anhydro-derivát  $\beta$ -CD (obrázek 3), tato skutečnost však nebyla přezkoumána.

V rámci této práce nebyly z časových důvodů cílové látky redukovány. Na ambidentních spojkách však bylo ukázáno, že problematickému chování thiolu vyplývajícímu z přítomnosti bazické aminoskupiny lze do jisté míry zabránit přípravou hydrochloridu dané látky, ve kterém aminoskupina díky protonaci ztrácí svoji bazicitu zodpovědnou za téměř okamžitou oxidaci.

## 4.2 Molekulová dynamika

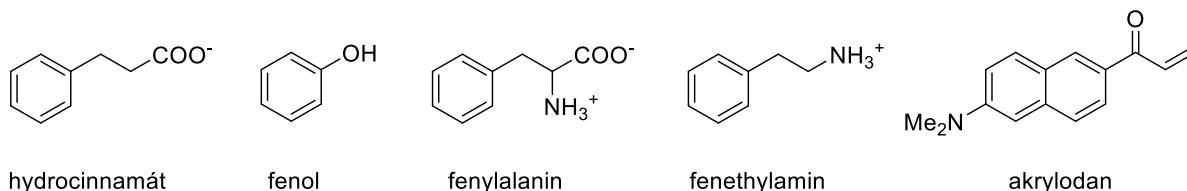
Výpočetní část této práce je věnována aplikaci molekulové dynamiky na supramolekulární systémy obsahující cyklodextrin. Na základě principů popsaných v kapitole 3.2 byla simulována inkluze vybraných molekul do kavity CD, dále byly počítány relativní vazebné energie  $\Delta G_{b,rel}$  a pro deriváty CD, které byly cílem syntetické části, bylo takto studováno chování ve vodném roztoku.

Všechny simulace byly provedeny za použití programu NAMD.<sup>112</sup> Aby bylo možné rozběhnout molekulárně-dynamické simulace, bylo nejprve potřeba přiřadit atomům v simulovaném systému parametry silového pole (rovnice 8-12). Pro všechny molekuly ligandů a cyklodextrinových derivátů byly tyto parametry získány pomocí webového serveru ParamChem<sup>125,126,127,128</sup> a parametry skleněného fragmentu byly získány z literatury.<sup>129</sup> Všechny simulace byly prováděny ve vodní obálce za použití periodických okrajových podmínek (tabulka 2). Pro molekuly vody a ionty bylo použito silové pole CHARMM36.<sup>126</sup>

Vstupní soubory a výsledky všech simulací byly vizualizovány pomocí programu VMD,<sup>130</sup> který byl použit i na vygerování vodní obálky.

### 4.2.1 Simulace inkluze ligandů do kavity $\beta$ -cyklodextrinu

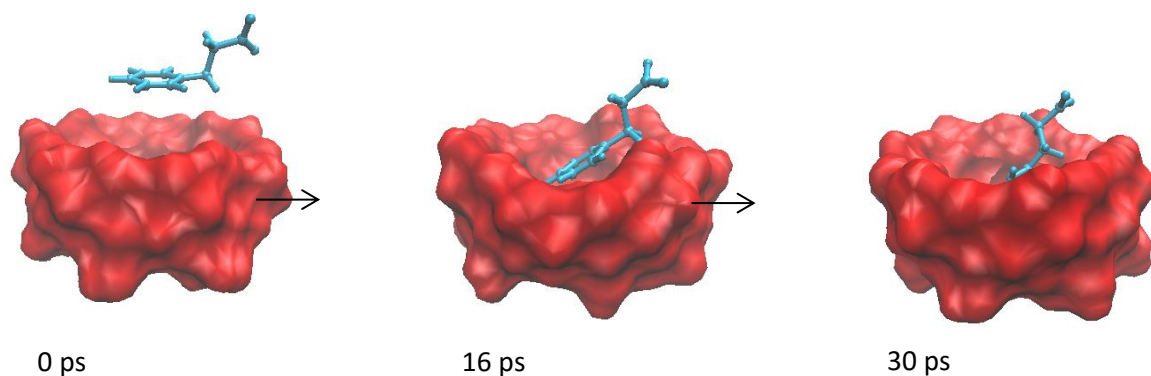
Jako první byly provedeny simulace inkluze několika ligandů do kavity  $\beta$ -CD. Ligandy, pro které byly tyto experimenty prováděny, jsou znázorněny na obrázku 21.



**Obrázek 21 – Molekuly, pro které byla provedena simulace s  $\beta$ -CD ve vodném roztoku a studována tak jejich inkluze do kavity.**

Nejprve byl proveden screening výchozích vzájemných poloh ligandu a  $\beta$ -CD. Pro hydrocinnamát byla nejlepší výchozí pozice (nejrychleji došlo k inkluzi) nad sekundárním (širším) okrajem  $\beta$ -CD (běh č. 1 v tabulce 2), přičemž aromatické jádro bylo umístěno přímo nad vstupem do kavity (sekundární okraj) a karboxylová skupina v blízkosti hydroxylových skupin (obrázek 22). Ligand se během inkluze vyzkoušené ve čtyřech bězích vždy otočil aromatickým jádrem směrem do kavity, nicméně když byla zkoušena simulace s již takto natočeným ligandem (tabulka 2), k inkluzi nedošlo. Takové chování je nejspíš důsledkem toho, že pro úspěšnou inkluzi ligandu je

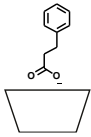
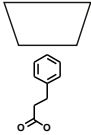
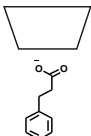
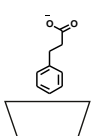
velmi významná interakce polární skupiny ligandu s hydroxylovými skupinami CD. Další simulace byly prováděny s optimalizovanou výchozí pozicí  $\beta$ -CD a ligandu (obrázek 23).



**Obrázek 22 – Časový vývoj simulované inkluze hydrocinamátu do kavity  $\beta$ -CD.**

**Tabulka 2 – Charakteristiky simulací provedených pro optimalizaci výchozí polohy.**

Číslo běhu	Vzájemná poloha CD a ligandu	Objem vodní obálky ( $\times 10^3 \text{ Å}^3$ )	Délka simulace (ps)	Čas, po kterém se ligand dostal do kavity (ps)
1		54,3	10 000	16
2		89,1	10 000	20
3		99,2	10 000	5 280
4		91,3	10 000	920
5		97,4	10 000	--

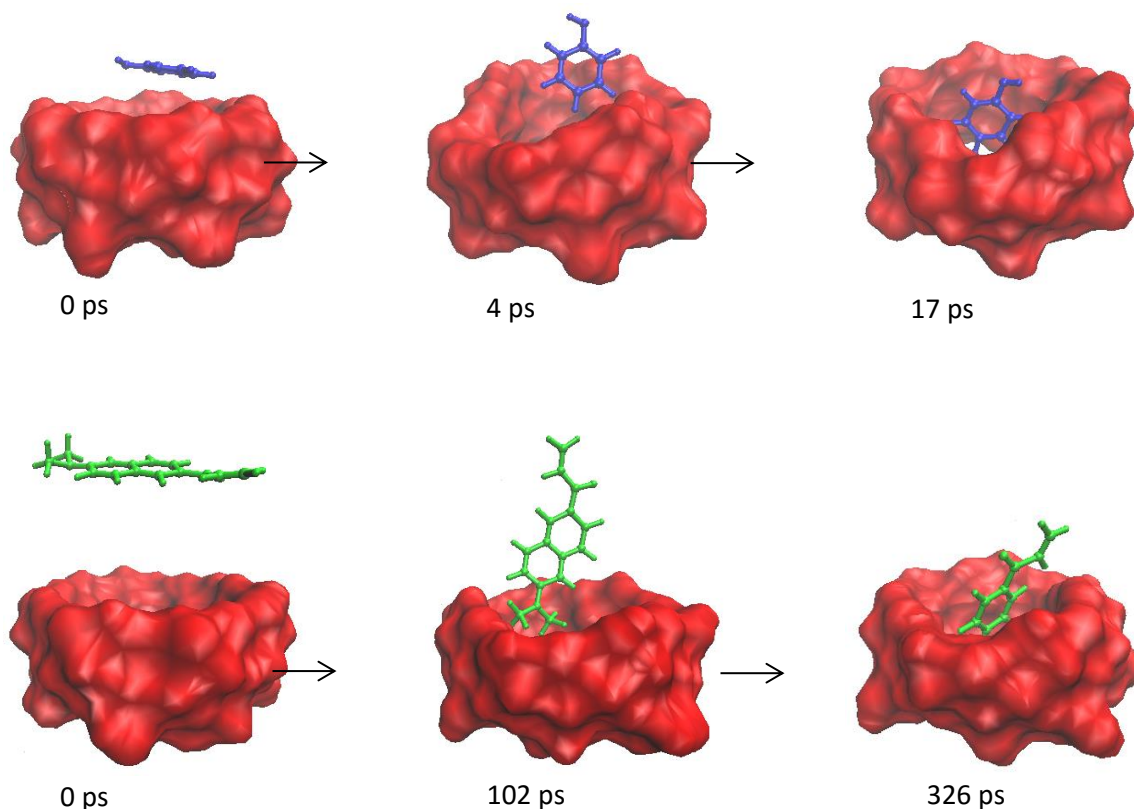
6		78,1	4 000	--
7		98,1	4 000	60
8		98,1	4 000	--
9		99,1	4 000	--

Podle dat v tabulce 2 lze soudit, že pro inkluzi ligandu je stěžejní blízkost nepolární skupiny ke vstupu do kavity (běhy č. 1, 2 a 7), nicméně nemusí být postačující (běh č. 9). Na základě pozorování výsledných simulací se zdá, že v bězích 1 a 2 byla inkluze tak úspěšná i díky počáteční blízkosti karboxylové skupiny k hydroxylům primárního či sekundárního okraje a jejímu „ukotvení“ na molekule CD pomocí vodíkových vazeb.

Dalšími simulovanými ligandy byly fenol a fenylalanin, které se při každém běhu ihned inkludovaly do kavity (obrázek 23), ve které zůstaly po celou dobu i při velmi dlouhých simulacích. Orientace fenolu v kavitě nebyla stálá, nicméně většinu času fenolický hydroxyl směřoval k sekundárnímu okraji, jak je vyobrazeno na obrázku 23. Molekula fenylalaninu byla simulována ve dvou různých formách – zwitteriontové formě a pro získání představy o vlivu nabitých skupin na proces inkluze i ve formě s nenabitými funkčními skupinami. Záporně nabitý karboxyl fenylalaninu ve zwitteriontové formě intenzivně interagoval s hydroxyly na sekundálním okraji CD, zatímco kladný naprotonovaný amin s těmito skupinami interagoval podstatně kratší dobu. Toto pozorování napovídá tomu, že záporně nabitá skupina přispívá k afinitě ligandu k CD výrazněji než skupina nabitá kladně.

Pro studium chování v roztoku společně s CD byl zvolen i akrylodan jakožto zástupce diskutovaných solvatochromních fluorofořů (3.3.3). Kvůli velikosti molekuly akrylodanu byla zvětšena počáteční vzdálenost ligandu od CD – aby byl poskytnut akrylodanu dostatečný prostor pro zaujetí ideální polohy pro inkluzi. Zde bylo provedeno šest běhů s různými vzájemnými

polohami akrylodanu a CD, ale pouze první vedl k úspěšné inkluzi molekuly do kavity CD (obrázek 23Obrázek 23).



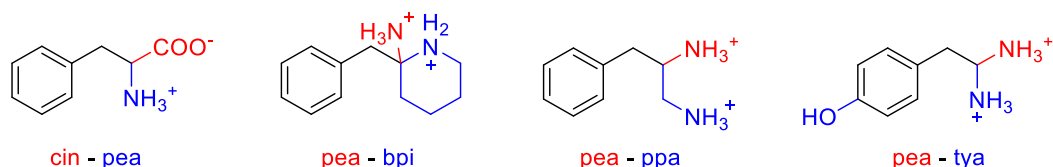
**Obrázek 23 – Časový vývoj simulované inkluze molekul fenolu a akrylodanu na kavity  $\beta$ -CD.**

Pro fenethylamin byla provedena pouze jedna simulace, přičemž se molekula vůbec neinkludovala, přestože měla identickou výchozí pozici jako hydrocinamát nebo fenol. Je tedy možné, že molekuly nesoucí kladně nabitou skupinu se skutečně inkludují hůře než molekuly neutrální nebo kladně nabitě.

#### 4.2.2 Výpočet relativních vazebných energií $\Delta G_{b,rel}$

Dále byla provedena série experimentů za účelem optimalizace metody pro výpočet relativní vazebné energie  $\Delta G_{b,rel}$  systému  $\beta$ -CD–ligand. Byla zvolena metoda alchymistické transformace FEP (free energy perturbation), při které bylo využito nefyzikální vzájemné přeměny dvou různých ligandů (schéma 7). Tyto ligandy byly voleny tak, aby měly co možná největší část společnou (aromatické jádro) a měněna mohla být pouze malá část molekuly (obrázek 24).





**Obrázek 24 – Hybridní molekuly, které byly použity pro alchymistické transformace. Červeně jsou vyznačeny části molekuly, které mizely, a modře části, které se objevovaly.**

Již bylo zmíněno, že je potřeba simulovat plynulou přeměnu pomocí ubírání/přidávání příspěvků molekul s koeficientem  $\lambda$ . Bylo vyzkoušeno více hodnot  $\lambda$  a různé délky termalizačních běhů (doba na „aklimatizaci“ systému na změnu příspěvků ligandů). Nejlepší shody s experimentálními hodnotami bylo dosaženo při volbě  $\lambda = 0,005$  a délkou 10 ps na  $\lambda$ .

V tabulce 3 jsou shrnuty výsledky těchto výpočtů a jejich porovnání s experimentálními hodnotami, které naměřili Goldberg et al.<sup>131</sup>.

**Tabulka 3 – Výsledky alchymistických simulací  $\Delta G_{b,rel}^{TEOR}$  a experimentální hodnoty  $\Delta G_{b,rel}^{EXP}$  131.**

	$\Delta G_{b,rel}^{EXP}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{b,rel}^{TEOR}$ (kJ/mol)	Směrodatná odchylka (kJ/mol)
cin→pea	-4,35	-2,66	2,72
pea→bpi	10,91	8,28	6,73
pea→ppa	3,69	2,41	2,21
pea→tya	2,66	7,55	1,48

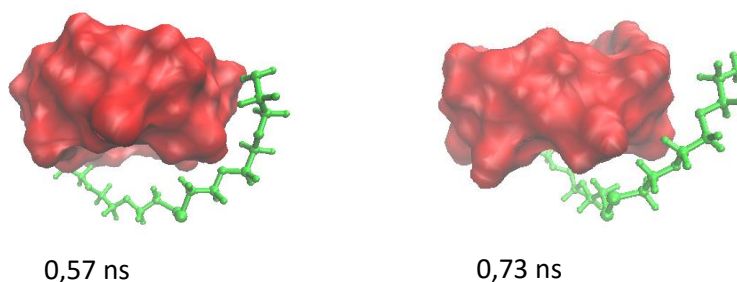
Výsledné relativní vazebné energie sice řádem a znaménkem odpovídají experimentálním hodnotám, nicméně z tabulky 3 je zřejmé, že vypočítané hodnoty jsou přeci jen velmi odchýlené od experimentálních a pro úspěšnější výpočet by byla potřeba další optimalizace. Na směrodatných odchylkách lze pozorovat korelaci s mírou podobnosti vzájemně přeměňovaných molekul – čím větší část ligandu je společná, tím spolehlivější hodnoty je možné získat.

Nicméně, optimalizace metody, která byla provedena v rámci této práce, nebyla dostatečná pro použití na ligandy se složitější strukturou.

#### 4.2.3 Simulace cílových derivátů $\beta$ -CD ve vodném roztoku

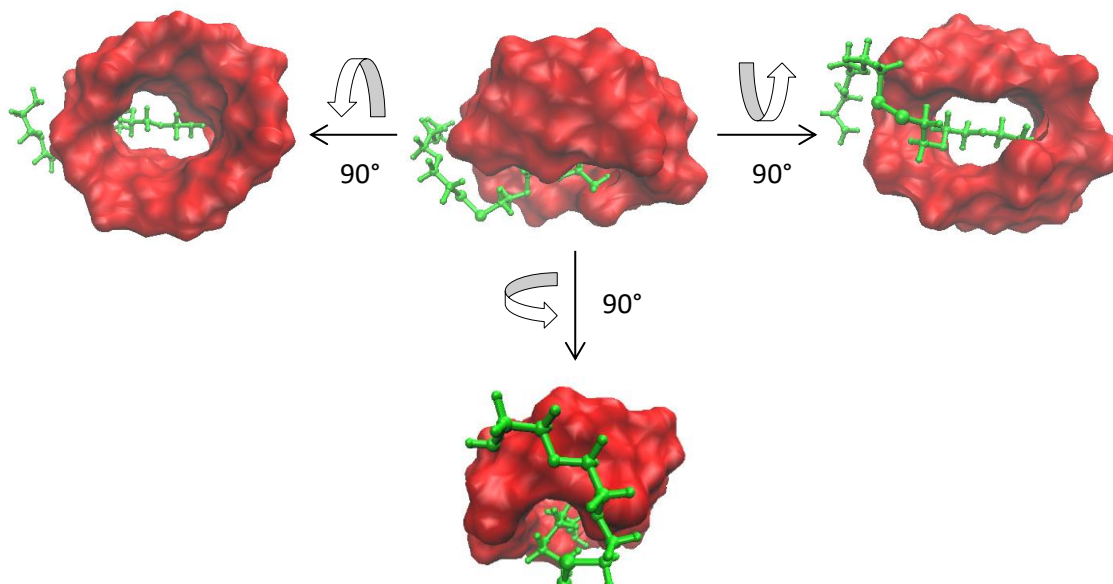
Deriváty  $\beta$ -CD, které byly cílem systetické části práce byly simulány ve vodném roztoku. Chování všech připravených derivátů bylo analogické až na rychlost, s jakou spojky zaujímaly nové pozice oproti molekule CD. Ta se snižovala s prodlužujícím se řetězcem spojky.

Z tohoto důvodu zde bude demonstrováno chování derivátů CD pouze na CD nesoucí triethylenglykolovou spojku (**4b**). Navzdory očekávání se do kavity CD neinkluovala spojka způsobem, že by byl CD „navlečen“ na řetězec. Ten se během simulace dlouhé 20 ns střídavě sbaloval a opět rozbaloval do roztoku. Nicméně většinu času zároveň výrazně interagoval s molekulou CD. V první části simulace (prvních 6 ns) se jednalo především o interakci s povrchem CD – řetězec spojky k němu přilnul a relativně dlouhou dobu tak setrval (obrázek 25).



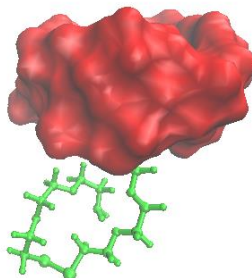
**Obrázek 25 – Simulovaná konformace derivátu 4b v časech 0,57 a 0,73 ns.**

V čase 6 ns se do kavity inkludovala proximální část spojky (bližší k molekule CD) a zůstala tak po zbytek simulace (obrázek 26). Inkludovaná část nevyplnila celý prostor kavity, ale držela se v blízkosti primárního (užšího) okraje. Zbytek řetězce se místy rozbalil do roztoku, nicméně převažovala interakce s povrchem CD nebo se sebou samým (obrázek 27).



**Obrázek 26 – Simulované konformace derivátu 4b v čase 6 ns. Vlevo je vyobrazen pohled na sekundární okraj derivátu CD, vpravo je pohled na primární okraj.**

Po inkluzi proximální části spojky jsem pozorovala deformaci molekuly CD, která takto usnadnila inkluzi části řetězce. Původní kruhové ústí kavity při primárním okraji nabylo elipsovitého tvaru vykloněním glukosových jednotek po stranách inkludovaného řetězce a celá molekula CD částečně zploštěla (obrázek 26).



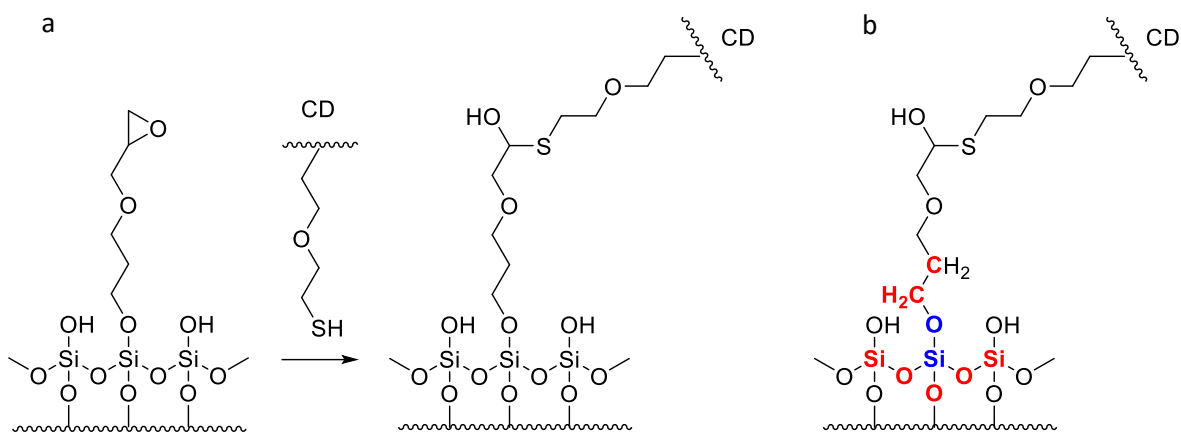
**Obrázek 27 – Simulovaná konformace derivátu 4b v čase 12,5 ns.**

#### **4.2.4 Model cyklodextrinového chemosenzoru ve vodném roztoku**

Jelikož zamýšlenou aplikací cílových derivátů  $\beta$ -CD byla vazba na pevný povrch za účelem konstrukce fluorescenčního chemosenzoru, byl proveden pokus o simulaci chování detektoru ve vodní obálce. V programu VMD<sup>130</sup> byl pomocí modulu MoleFactory zkonstruován fragment zamýšleného detektoru za použití tetraethylenglykolových spojek, skleněné destičky (krystalová struktura<sup>132</sup> získaná z CDS),<sup>133</sup>  $\beta$ -CD jako receptoru a akrylodanu jakožto solvatochromního fluoroforu.

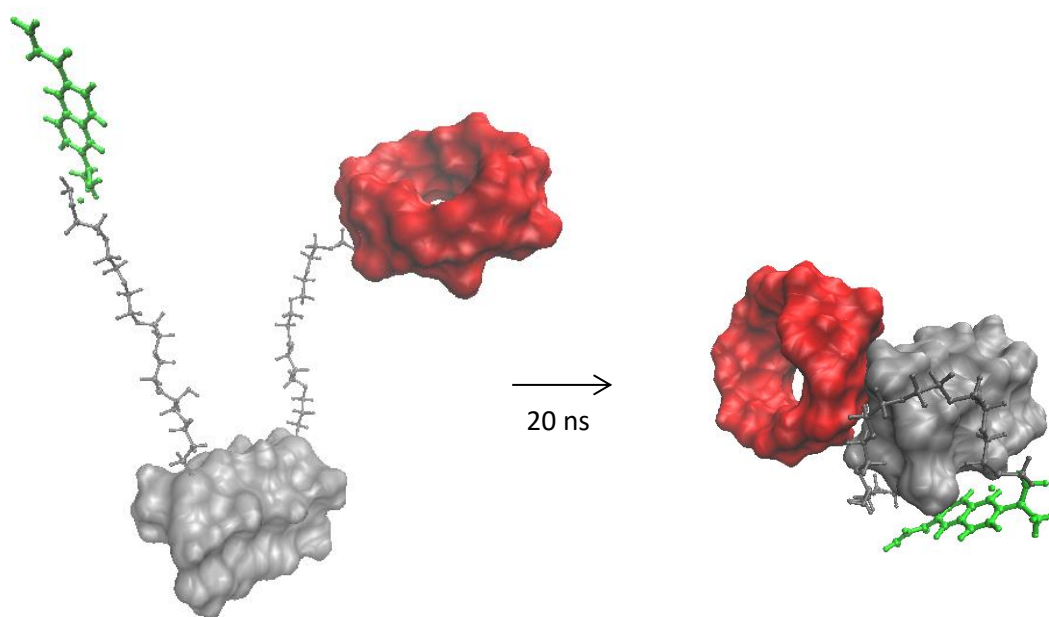
Záměr je cílový derivát redukovat na thiol a ten vázat na skleněný povrch modifikovaný epoxidem (schéma 17a). Parametry pro všechny atomy byly získány výše zmíněným způsobem, problematické však bylo naparametrizovat konjugát skla a spojky, neboť parametry každého z nich byly získány jiným způsobem. Pro atom křemíku, který se účastnil etherické vazby mezi sklem a spojkou, byly použity stejné parametry jako pro ostatní křemíkové atomy obklopené siloxyskupinami s výjimkou dihedrálních úhlů s účastí atomů uhlíku spojky, kde byly použity hodnoty pro dialkylether. Pro etherický atom kyslíku přímo vázaný na sklo byla použita většina parametrů pro dialkylether, pouze pro dihedrální úhly s účastí dvou atomů křemíku byly použity parametry pro kyslík účastnící se siloxyskupiny (schéma 17b).

Po úspěšné parametrizaci byla rozběhnuta simulace konjugátu ve vodném roztoku. Systém se bohužel nechoval podle očekávání. Místo toho, aby se akrylodan inkludoval do kavity CD, byly linkery, akrylodan i CD adsorbovány na skleněnou destičku (obrázek 28). V simulaci o délce 20 ns došlo k adsorpci molekul již po 4,7 ns a vzniklá konformace konjugátu byla zachována po celý zbytek simulace.



**Schéma 17 – a) Příklad konstrukce cyklodextrinového chemosenzoru, b) zvýraznění atomů náročných na parametrizaci – modré jsou atomy zprostředkující vazbu spojky na skleněný povrch a červené jsou atomy, které jsou s nimi spojeny přes 1-3 vazby a potřebovaly ručně specifikovat parametry silového pole.**

Pokud je výsledek relevantní a není zatížen chybou vzniklou parametrizací, může být velmi užitečný pro porozumění chování vyvíjených chemosenzorů. Sklo by mělo být pro lepší funkci senzoru modifikováno takovým způsobem, aby byla snížena sorpce molekul na jeho povrch a prodloužen tak jejich pohyb v okolním rozpouštědle.



**Obrázek 28 – Počáteční a výsledná konformace konjugátu  $\beta$ -CD–spojka–sklo–spojka–akrylodan. Výsledná konformace byla získána z posledního snímku simulace dlouhé 20 ns.**

## 5 Závěr

V rámci této práce byly úspěšně připraveny 6<sup>l</sup>-N-substituované deriváty  $\beta$ -cyklodextrinu vazbou předem připravených disulfidických spojek zakončených aminoskupinami. Tyto deriváty by měly posloužit jako prekurzory použitelné pro konstrukci fluorescenčních chemosenzorů.

Látky, pro jejichž přípravu byly použity spojky odvozené od di-, tri a tetraethylenglykylu, byly připraveny ve velmi dobrých výtěžcích 66 – 85 %. Oproti tomu derivatizace vazbou cystaminu na  $\beta$ -CD měla poloviční výtěžnost (35 %). Tento rozdíl ve výtěžnosti reakcí tosyl- $\beta$ -CD s cystaminem a oligoethylenglykolovými spojkami by mohl být vysvětlen rozdílem jejich polarit, z něhož pravděpodobně plyne i rozdíl v afinitě ke kavitě  $\beta$ -CD. Tuto hypotézu podporují i molekulárně dynamické simulace, které byly v rámci této práce provedeny.

Oligoethylenglykolové spojky byly připraveny šestikrokovou syntézou pomocí standardních chemických přeměn. Během jejich přípravy se podařilo izolovat dosud nepublikované (v případě diethylenglykolové spojky) či spoře opublikované (tri- a tetraethylenglykolové spojky) látky obsahující sulfanylovou a aminovou skupinu ve formě hydrochloridu.

Všechny dosud nepublikované deriváty  $\beta$ -CD byly jednoznačně charakterizovány pomocí 2D NMR spekter.

Za účelem studia chování systémů, které mají posloužit k vývoji fluorescenčních senzorů, byla provedena série MD simulací inkluze organických molekul do kavity  $\beta$ -CD. Za tímž účelem byla optimalizována MD metoda pro výpočet relativních vazebných energií aromatických ligandů a  $\beta$ -CD. Aby byla metoda skutečně použitelná, je potřeba další optimalizace, nicméně výsledky řádem i znaménkem odpovídají experimentálním hodnotám.

V neposlední řadě byl pomocí MD simulován konjugát  $\beta$ -CD–skleněný povrch–solvatochromní fluorofor, který měl být molekulárním modelem fluorescenčního chemosenzoru. Tento konjugát však nevykazoval očekávané chování (inkluze fluoroforu do kavity  $\beta$ -CD), ale všechny molekuly byly adsorbovány na skleněný fragment. Tento poznatek by mohl být velmi užitečný při následném designu a vývoji podobných chemosenzorů.

## 6 Experimentální část

### 6.1 Syntéza

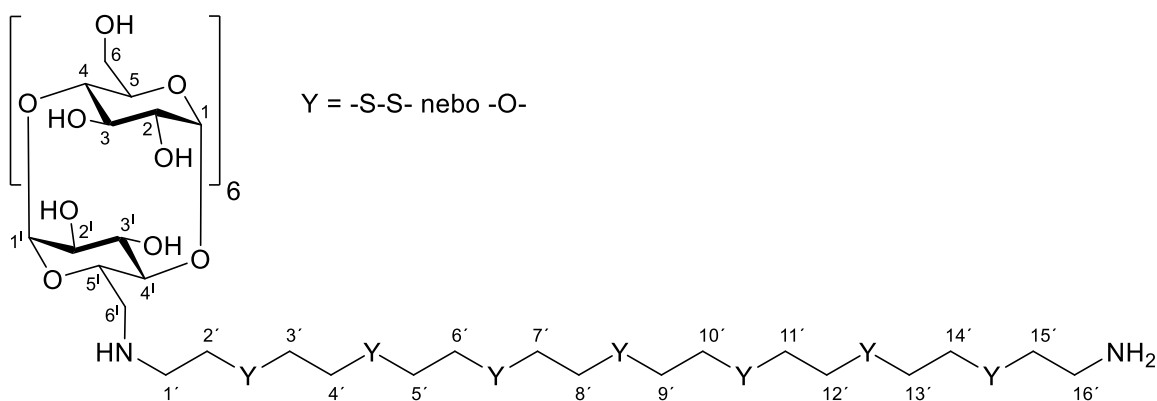
#### 6.1.1 Chemikálie a přístroje

Běžné chemikálie a rozpouštědla byla pořízena od firmy PENTA, speciální chemikálie a rozpouštědla od firmy Aldrich.  $\beta$ -cyklodextrin byl zakoupen od firmy WAKO Chemicals. Rozpouštědla byla destilována, DMF, DMSO byly sušeny pomocí 3 Å molekulových sít, *n*-butanol destilován nebyl. Pro práci v inertní atmosféře byl používán argon.

Probublávání vzduchem pro oxidace bylo prováděno pomocí akvarijního kompresoru s tlakem 1,1 atm.

Pro separace sloupcovou chromatografií byl používán Silikagel 60 (0,040–0,063 mm) a silný katex Amberlite® IR120. Pro chromatografie na tenké vrstvě byly používány aluminiové destičky s vrstvou Silikagelu 60 F254 nebo s reverzním Silikagelem 60 RP-18 F254S, vše dodala firma Merck. Detekce byla prováděna pomocí UV lampy ( $\lambda = 254$  nm), bazického roztoku manganistanu draselného (0,5 g  $\text{KMnO}_4$ , 0,4 g NaOH, 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ), roztoku ninhydrinu s kyselinou octovou (0,3 g ninhydrinu, 3 ml HOAc, 100 ml EtOH) nebo karbonizací – zahřátím horkovzdušnou pistolí po ponoření do 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian VNMRs 300 ( $\nu(^1\text{H}) = 299,94$  MHz,  $\nu(^{13}\text{C}) = 75,43$  MHz) a Bruker AVANCE III 600 ( $\nu(^1\text{H}) = 600,17$  MHz,  $\nu(^{13}\text{C}) = 150,04$  MHz). NMR spektra derivátů neobsahujících CD s výjimkou tosyl- $\beta$ -CD byla měřena na přístroji Varian.  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektra derivátů CD byla měřena na spektrometru Bruker. NMR charakterizace nově připravených derivátů CD byla provedena pomocí  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT a 2D NMR experimentů COSY, HSQC a HMBC měřených také na spektrometru Bruker. Příslušné atomy CD byly číslovány tak, jak znázorňuje obrázek 29. Chemické posuny ( $\delta$ ) jsou uvedeny v hodnotách ppm a interakční konstanty ( $J$ ) v Hz. Pro přehlednost jsou ve výpisech NMR spekter použity tečky místo desetinných čárek.



**Obrázek 29 - Číslování atomů CD derivátů použité ve výpisech NMR spekter.**

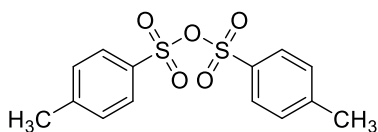
Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 ES-ion trap. Ionizace byla po rozpuštění vzorků v methanolu prováděna elektrosprejem. Toto měření bylo provedeno u dosud nepublikovaných necyklodextrinových meziproduktů a všech sloučenin obsahujících CD skelet. Jedinou výjimkou jsou některé ethylenglykolové deriváty s alespoň jednou sulfanylovou skupinou, jejichž MS spektra nebyla interpretovatelná z důvodu jejich oxidace na disulfidy. Jejich výpisy MS spekter tedy nejsou uvedeny.

Všechny CD deriváty byly před charakterizací sušeny ve vakuu (10 Pa) při 50 °C minimálně 5 hodin.

V následující kapitole jsou popsány pouze metody poskytující daný produkt v nejvyšším výtěžku.

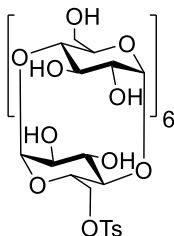
### 6.1.2 Pracovní postupy

#### *p*-Toluensulfonylanhydrid (**12**)



*p*-Toluensulfonylanhydrid (**12**) byl připraven postupem převzatým z literatury.<sup>71</sup> Ve 37 ml dichlormethanu byl suspendován 98% *p*-toluensulfonylchlorid (10,139 g; 52,1 mmol; 1 ekv.) a 98% kyselina *p*-toluensulfonová (2,528 g; 13,3 mmol; 0,25 ekv.) a vzniklá směs byla míchána 20 hodin při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs filtrována přes sloupec silikagelu a promyta 10 ml DCM. Filtrát byl zahuštěn na RVO na 5 ml a ponechán přes noc při 4 °C. Vyloučené krystaly byly ze směsi odděleny přesátím přes S3 fritu a dosušeny na RVO. Tímto postupem byl připraven *p*-toluensulfonylanhydrid (**12**) (8,771 g; 26,9 mmol; 82 %) ve formě bílých krystalů (výtěžek byl počítán vzhledem k součtu obou reagentů). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.93 (d, *J* = 8.844 Hz, 4 H, 4 × CH), 7.41 (d, *J* = 8.040 Hz, 4 H, 4 × CH), 2.49 (s, 6 H, 2 × CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI): [M/2 + Na]<sup>+</sup> = 186. Pro ½ (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>) vypočteno 186,01.

#### 6'-*O*-*p*-Toluensulfonyl-β-cyklodextrin (**1**)

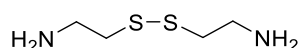


Tosyl β-CD (**1**) byl připraven postupem převzatým z literatury.<sup>71</sup> Do baňky byl navážen 90% β-CD (15,40 g; 12,2 mmol; 1 ekv.) a *p*-toluensulfonylanhydrid (**12**) (5,60 g; 17,2 mmol; 1,26 ekv.) a přidáno 400 ml vody. Směs byla míchána 1,5 hodiny při laboratorní teplotě (11 °C). Následně byla teplota zvýšena pomocí vodní lázně na 28 °C a směs byla míchána další 1,5 hodiny při této teplotě. Poté byl ke směsi za stálého míchání přikapán 8,6M vodný roztok hydroxidu sodného (20 ml; 173 mmol; 10 ekv.) a vzniklá směs byla míchána ještě 20 minut. Vzniklá sraženina byla přesáta přes S3 fritu. K filtrátu byl přidán chlorid amonný (19,4 g; 363 mmol; 21 ekv.) a 15% kyselina chlorovodíková (34 ml; do pH ≈ 3 podle lakmusového papírku). Směs byla ponechána přes noc při 4 °C. Vzniklé krystaly byly odděleny ze směsi přesátím přes S3 fritu a promyty 10 ml vychlazené vody (4 °C). Produkt byl třikrát přečištěn krystalizací z 50 % methanolu (pro rozpuštění krystalů byl vždy použit přibližně třináctinásobek jejich hmotnosti). Pomocí TLC bylo zjištěno, že v krystalizačních filtrátech zůstalo nezanedbatelné množství produktu. Proto byly filtráty odpařeny



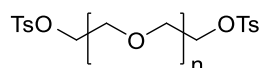
na RVO a třikrát překrystalovány zmíněnou metodou. Produkty krystalizací byly spojeny a sušeny při 70 °C na vysokém vakuu. Tímto postupem byl získán *p*-toluensulfonyl- $\beta$ -CD (**1**) (2,814 g; 2,2 mmol; 17,9 %) ve formě jemných bílých krystalů. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % HOAc = 5/8/6/0,5; R<sub>f</sub> = 0,77; detekce: 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, 2  $\times$  CH), 7.43 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, 2  $\times$  CH), 5.86 – 5.55 (m, 14H, 7  $\times$  OH-2, 7  $\times$  OH-3), 4.88 – 4.73 (m, 8H, 7  $\times$  CH-1), 4.55 – 4.39 (m, 6H, 6  $\times$  OH-6), 3.70 – 3.34 (m, 22H,  $\times$  CH), 2.43 (s, 3H, 1  $\times$  CH<sub>3</sub>).

### 3,4-Dithiahexan-1,6-diamin (**13**)



Postup přípravy cystaminu (**13**) byl inspirován literaturou.<sup>80,83</sup> Cysteamin (3,971 g; 51,6 mmol; 1 ekv) byl rozpuštěn ve směsi 60 ml methanolu a 20 ml 25% amoniaku. Baňka byla opatřena septem a směs byla 1 týden probublávána vzduchem pomocí akvarijního motorku za stálého doplňování methanolu a roztoku amoniaku. Poté byla reakční směs přesáta přes S4 fritu a filtrát odpařen na RVO. Tímto postupem byl získán cystamin (**13**) (3,660 g; 24,0 mmol; 93 %) ve formě žlutohnědé mazlavé pevné látky. Reakce byla sledována pomocí TLC – MeOH/25 % NH<sub>3</sub> = 10/1; R<sub>f</sub> = 0,68; detekce: ninhydrin. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 2.94 (t, *J* = 6.204 Hz, 2 H, 1  $\times$  CH<sub>2</sub>), 2.76 (t, *J* = 6.753 Hz, 2 H, 1  $\times$  CH<sub>2</sub>) ppm. MS (ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 152,9. Pro C<sub>4</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> vypočteno 153,05.

### Ditosylace oligoethylenglykolů – obecný postup (OP1)



Látky **5a-c** byly připraveny podle literatury.<sup>134</sup> Oligoethylenglykol (1 ekv.) a *p*-toluensulfonylchlorid (2 ekv.) byly suspendovány v DCM (15 ekv.) a vzniklá směs byla chlazená ledovou lázní. Následně bylo za stálého míchání postupně (během 20 minut) přidáno 8 ekv. drceného hydroxidu draselného. Reakční směs byla míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě a poté naředěna nadbytkem chloroformu (3:1) a vytřepána vodou (1:1). Chloroformová fáze byla ještě dvakrát extrahována vodou (1:1) a následně sušena síranem hořečnatým přes noc. Sušidlo bylo odstraněno přesátím přes S3 fritu a filtrát byl odpařen na RVO. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC.

### 3-Oxapentan-1,5-diyl-bis(*p*-toluensulfonát) (*n* = 1) (**5a**)

Postupem **OP1** byl z diethylenglykolu (10,138 g; 95,6 mmol) získán ditosyl-diethylenglykol (**5a**) (37,040 g; 89,5 mmol; 93 %) ve formě bílých krystalů. TLC – Hex/EtOAc = 2/1; R<sub>f</sub> = 0,22;

detekce UV,  $\text{KMnO}_4$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.78 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 4 H, 4  $\times$  CH), 7.35 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 4 H, 4  $\times$  CH), 4.09 (t,  $J$  = 4.6 Hz, 4 H, 2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 3.61 (t,  $J$  = 4.6 Hz, 4 H, 2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 2.45 (s, 6 H, 2  $\times$   $\text{CH}_3$ ) ppm. MS (ESI):  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 437,0$ . Pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{S}_2$  vypočteno 437,07.

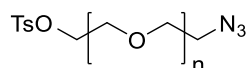
### 3,6-Dioxaoktan-1,8-diyl-bis(*p*-toluensulfonát) ( $n = 2$ ) (5b)

Postupem **OP1** byl z triethylenglykolu (5,101 g; 34,0 mmol) získán ditosyl-triethylenglykol (**5b**) (14,830 g; 32,3 mmol; 96 %) ve formě bílé pevné látky. TLC – Hex/EtOAc = 1/1;  $R_f$  = 0,34; detekce UV,  $\text{KMnO}_4$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.76 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 4 H, 4  $\times$  CH), 7.30 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 4 H, 4  $\times$  CH), 4.10 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 4 H, 2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 3.62 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 4 H, 2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 3.49 (s, 4 H, 2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 2.41 (s, 6 H, 2  $\times$   $\text{CH}_3$ ). MS (ESI):  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 481,0$ . Pro  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{NaO}_8\text{S}_2$  vypočteno 481,10.

### 3,6,9-Trioxaundekan-1,11-diyl-bis(*p*-toluensulfonát) ( $n = 3$ ) (5c)

Postupem **OP1** byl z tetraethylenglykolu (4,927 g; 25,4 mmol) získán ditosyl-tetraethylenglykol (**5c**) (12,316 g; 24,5 mmol; 97 %) ve formě čiré velmi viskózní kapaliny. TLC – Hex/EtOAc = 1/1;  $R_f$  = 0,25; detekce UV,  $\text{KMnO}_4$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.78 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 4 H, 4  $\times$  CH), 7.33 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 4 H, 4  $\times$  CH), 4.15 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 4 H, 2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 3.67 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 4 H, 2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 3.62 – 3.48 (m, 8 H, 4  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 2.44 (s, 6 H, 2  $\times$   $\text{CH}_3$ ) ppm. MS (ESI):  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 525,0$ . Pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NaO}_9\text{S}_2$  vypočteno 525,12.

### Monoazidace ditosyl-oligoethylenglykolů – obecný postup (OP2)



Látky **6a-c** byly připraveny podle literatury.<sup>135</sup> Bis(toluensulfonyl)oligoethylenglykol (**5a-c**) (1 ekv.) a azid sodný (1,1 ekv.) byly suspendovány ve 160 ekv. ethanolu. Směs byla míchána 2,5 hodiny na olejové lázni pod zpětným chladičem při 80 °C a následně 2 hodiny nechána zchladnout na laboratorní teplotu. Po zchladnutí byla směs naředěna chloroformem (1:1), třikrát extrahována vodou (1:1) a organická fáze byla odpařena na RVO. Složky reakční směsi byly separovány pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC.

### 5-Azido-3-oxapentán-1-yl-(*p*-toluensulfonát) ( $n = 1$ ) (6a)

Postupem **OP2** byl z ditosyl-diethylenglykolu (**5a**) (12,120 g; 29,3 mmol) a azidu sodného (2,129 g; 32,8 mmol) připraven monoazido-diethylenglykol (**6a**) (3,168 g; 11,1 mmol; 38 %) ve formě čiré viskózní kapaliny. TLC – Hex/EtOAc = 2/1;  $R_f$  = 0,43; detekce UV,  $\text{KMnO}_4$ . Sloupcová chromatografie – Hex/EtOAc = 3/1.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.81 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H, 2  $\times$  CH), 7.35 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2 H, 2  $\times$  CH), 4.18 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2 H, 1  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 3.71 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2 H, 1  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 3.61 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 2 H, 1  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 3.32 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2 H, 1  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 2.45 (s, 3 H, 1  $\times$   $\text{CH}_3$ ) ppm.

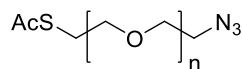
### 8-Azido-3,6-dioxaoktan-1-yl-(*p*-toluensulfonát) (*n* = 2) (**6b**)

Postupem **OP2** byl z ditosyl-triethylenglykolu (**5b**) (1,913 g; 4,18 mmol) a azidu sodného (0,315 g; 4,8 mmol) připraven monoazido-triethylenglykol (**6b**) (0,735 g; 2,2 mmol; 53 %) ve formě čiré viskózní kapaliny. TLC – Hex/EtOAc = 2/1; *R<sub>f</sub>* = 0,26; detekce UV, KMnO<sub>4</sub>. Sloupcová chromatografie – Hex/EtOAc = 2/1. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, 2 × CH), 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, 2 × CH), 3.73 – 3.58 (m, 8H, 4 × CH<sub>2</sub>), 3.37 (t, *J* = 5.1 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.45 (s, 3 H, 1 × CH<sub>3</sub>) ppm.

### 11-Azido-3,6,9-trioxaundekan-1-yl-(*p*-toluensulfonát) (*n* = 3) (**6c**)

Postupem **OP2** byl připraven z ditosyl-tetraethylenglykolu (**5c**) (1,255 g; 2,50 mmol) a azidu sodného (0,191 g; 2,9 mmol) monoazido-tetraethylenglykol (**6c**) (0,467 g; 1,3 mmol; 50 %) ve formě čiré viskózní kapaliny. TLC – Hex/EtOAc = 2/1; *R<sub>f</sub>* = 0,20; detekce UV, KMnO<sub>4</sub>. Sloupcová chromatografie – Hex/EtOAc = 1/1. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, 2 × CH), 7.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, 2 × CH), 3.74 – 3.56 (m, 12 H, 6 × CH<sub>2</sub>), 3.38 (t, *J* = 5.1 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.45 (s, 3 H, 1 × CH<sub>3</sub>) ppm.

### Thioacetylace monoazido-toluensulfonyl-oligoethylenglykolů – obecný postup (**OP3**)



Látky **7a-c** byly připraveny podle literatury.<sup>136</sup> Azido-toluensulfonyl-oligoethylenglykol (**6a-c**) (1 ekv.) a thioacetát draselný (1,5 ekv.) byly suspendovány ve 110 ekv. ethanolu. Takto připravená směs byla 20 hodin míchána při 70 °C pod zpětným chladičem na olejové lázni. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byla naředěna nadbytkem vody (2:1). Produkt byl vytřepán do chloroformu (1:1), chloroformová fáze byla ještě dvakrát extrahována vodou a odpařena na RVO. Produkt byl následně čištěn filtrací přes sloupec silikagelu. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC.

### S-(5-Azido-3-oxapentan-1-yl)-thioacetát (*n* = 1) (**7a**)

Postupem **OP3** byl z azido-toluensulfonyl-diethylenglykolu (**6a**) (2,086 g; 7,31 mmol) a thioacetátu draselného (1,121 g; 9,83 mmol) připraven azido-thioacetyl-diethylenglykol (**7a**) (1,233 g; 6,52 mmol; 89 %), ve formě nažloutlého oleje. TLC – Hex/EtOAc = 2/1; *R<sub>f</sub>* = 0,65; detekce KMnO<sub>4</sub>. Filtrace na silikagelu – Hex/EtOAc = 3/1. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.70 – 3.57 (m, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.38 (t, *J* = 5.7, 4.4 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 3.11 (t, *J* = 6.3 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.35 (s, 3 H, 1 × CH<sub>3</sub>). MS (ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 211,9. Pro C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>S vypočteno 212,05.

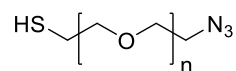
### S-(8-Azido-3,6-dioxaoktan-1-yl)-thioacetát (n = 2) (7b)

Postupem **OP3** byl z (2,050 g; 6,20 mmol) azido-toluensulfonyl-triethylenglykolu (**6b**) a thioacetátu draselného (1,002 g; 5,56 mmol) připraven azido-thioacetyl-triethylenglykol (**7b**) (1,391 g; 5,96 mmol; 96 %) ve formě žlutého oleje. TLC – Hex/EtOAc = 2/1; R<sub>f</sub> = 0,42; detekce KMnO<sub>4</sub>. Filtrace na silikagelu – Hex/EtOAc = 3/1. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.72 – 3.58 (m, 8 H, 4 × CH<sub>2</sub>), 3.39 (t, J = 5.5 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 3.10 (t, J = 6.4 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.34 (s, 3 H, 1 × CH<sub>3</sub>). MS (ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 255,9. Pro C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>S vypočteno 256,07.

### S-(11-Azido-3,6,9-trioxaundekan-1-yl)-thioacetát (n = 3) (7c)

Postupem **OP3** byl z (2,039 g; 5,46 mmol) azido-toluensulfonyl-tetraethylenglykolu (**6c**) a thioacetátu draselného (0,916 g; 8,04 mmol) připraven azido-thioacetyl-tetraethylenglykol (**7c**) (1,370 g; 4,94 mmol; 90 %) ve formě nažloutlého oleje. TLC – Hex/EtOAc = 2/1; R<sub>f</sub> = 0,33; detekce KMnO<sub>4</sub>. Filtrace na silikagelu – Hex/EtOAc = 2/1. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.72 – 3.57 (m, 12 H, 6 × CH<sub>2</sub>), 3.39 (t, J = 5.1 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 3.10 (t, J = 6.5 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.34 (s, 3 H, 1 × CH<sub>3</sub>). MS (ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 300,0. Pro C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>S vypočteno 300,10.

### Hydrolyza azido-thioacetyl-oligoethylenglykolů – obecný postup (OP4)



Látky **8a-c** byly připraveny podle literatury.<sup>136</sup> Roztok methanolu, vody a 35% kyseliny chlorovodíkové (po řadě 37 ekv., 89 ekv. a 1,4 ekv.) byl nejprve probublán argonem (5 minut), vystaven ultrazvuku (10 minut) a znovu probublán argonem (10 minut). Azido-thioacetyl-oligoethylenglykol (**7a-c**) (1 ekv.) byl emulgován s degazovaným roztokem methanolu, vody a kyseliny chlorovodíkové a míchán 2,5 hodiny při 110 °C na olejové lázni pod zpětným chladičem. Po zchlazení na laboratorní teplotu byla směs naředěna vodou (1:1) a extrahována chloroformem (1:1). Chloroformová fáze byla ještě dvakrát promyta vodou (1:1) a odpařena na RVO. Produkt byl čištěn filtrací přes sloupec silikagelu. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC.

### 5-Azido-3-oxapentán-1-thiol (n = 1) (7a)

Postupem **OP4** byl z azido-thioacetyl-diethylenglykolu (**7a**) (519 mg; 2,75 mmol) získán azido-sulfanyl-diethylenglykol (**8a**) (310 mg; 2,11 mmol; 77 %) ve formě sytě žlutého oleje. TLC – CHCl<sub>3</sub>; R<sub>f</sub> = 0,71; detekce KMnO<sub>4</sub>. Filtrace – Hex/EtOAc = 1/1. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.71 – 3.59 (m, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.39 (t, J = 5.0 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.71 (dt, J = 8.3, 6.3 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 1.63 (t, J = 8.3 Hz, 1 H, 1 × SH).

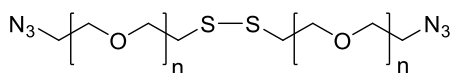
### 8-Azido-3,6-dioxaoktan-1-thiol ( $n = 2$ ) (**8b**)

Postupem **OP4** byl z azido-thioacetyl-triethylenglykolu (**7b**) (440 mg; 1,89 mmol) získán azido-sulfanyl-triethylenglykol (**8b**) (331 mg; 1,76 mmol; 92 %) ve formě žlutého oleje. TLC –  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100/1$ ;  $R_f = 0,76$ ; detekce  $\text{KMnO}_4$ . Filtrace – Hex/EtOAc = 1/1.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.73 - 3.58$  (m, 8 H,  $4 \times \text{CH}_2$ ), 3.41 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.70 (dt,  $J = 8.2, 6.4$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 1.58 (t,  $J = 8.2$  Hz, 1 H,  $1 \times \text{SH}$ ).

### 11-Azido-3,6,9-trioxaundekan-1-thiol ( $n = 3$ ) (**8c**)

Postupem **OP4** byl získán z azido-thioacetyl-tetraethylenglykolu (**7c**) (812 mg; 2,93 mmol) azido-sulfanyl-tetraethylenglykol (**8c**) (644 mg; 2,74 mmol; 94 %) ve formě světle žlutého oleje. TLC –  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100/1$ ;  $R_f = 0,50$ ; detekce  $\text{KMnO}_4$ . Filtrace – Hex/EtOAc = 1/1.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.73 - 3.58$  (m, 12 H,  $6 \times \text{CH}_2$ ), 3.39 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.70 (dt,  $J = 8.2, 6.4$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 1.61 (t,  $J = 8.2$  Hz, 1 H,  $1 \times \text{SH}$ ).

### Oxidace azido-sulfanyl-oligoethylenglykolů na disulfid – obecný postup (**OP5**)



Látky **9a-c** byly připraveny postupem inspirovaným literaturou.<sup>120</sup> Azido-sulfanyl-oligoethylenglykol (**8a-c**) (1 ekv.) byl rozpuštěn v 90 ekv. methanolu. Směs byla provzdušněna opakovaným nasátím a vysátím injekční stříkačkou a vystavena ultrazvuku na 30 minut. Methanol byl ze směsi odpařen na RVO. Průběh reakce byl sledován pomocí NMR.

### 3,10-Dioxa-6,7-dithiadodekan-1,12-diazid ( $n = 1$ ) (**9a**)

Postupem **OP5** byl z thiolu **8a** (310 mg; 2,11 mmol) získán disulfid **9a** (200 mg; 0,63 mmol; 60 %) ve formě nažloutlého oleje.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.76$  (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 3.66 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 3.39 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.91 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ). MS (ESI):  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 315,1$ . Pro  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_6\text{NaO}_2\text{S}_2$  vypočteno 315,07.

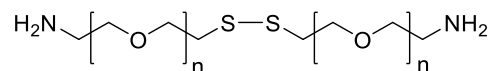
### 3,6,13,16-Tetraoxa-9,10-dithiaoktadekan-1,18-diazid ( $n = 2$ ) (**9b**)

Postupem **OP5** byl z thiolu **8b** (98 mg; 0,51 mmol) získán disulfid **9b** (94 mg; 0,25 mmol; 96 %) ve formě nažloutlého viskózního oleje.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.75$  (t,  $J = 6.7$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 3.72 – 3.61 (m, 6 H,  $3 \times \text{CH}_2$ ), 3.40 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.90 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ).

### 3,6,9,16,19,22-Hexaoxa-12,13-dithiatetrakosan-1,24-diazid ( $n = 3$ ) (**9c**)

Postupem **OP5** byl z thiolu **8c** (402 mg, 1,71 mmol) získán disulfid **9c** (275 mg; 0,56 mmol; 65 %) ve formě nažloutlého viskózního oleje.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.74$  (t,  $J = 6.7$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 3.71 – 3.63 (m, 10 H,  $5 \times \text{CH}_2$ ), 3.39 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.89 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ). MS (ESI):  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 491,1$ . Pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{NaO}_6\text{S}_2$  vypočteno 491,17.

### Staudingerova redukce diazido-disulfidů – obecný postup (**OP6**)



Látky **10a-c** byly připraveny podle literatury.<sup>137</sup> Diazido-dithia-oligoethylenglykol (**9a-c**) a 2,2 ekv. trifenyfosfinu byly rozpuštěny v 60 ekv. ethanolu. Směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Po ukončení míchání byla směs naředěna nadbytkem 50% methanolu a produkt byl čištěn přes silný katex. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC.

### 3,10-Dioxa-6,7-dithiadodekan-1,12-diamin ( $n = 1$ ) (**10a**)

Postupem **OP6** byl z diazidu (**9a**) (200 mg; 0,68 mmol) získán diamin (**10a**) (155 mg; 0,65 mmol; 95 %) ve formě lehce nažloutlé gelovité látky. TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % NH<sub>3</sub> = 5/2/2/1; R<sub>f</sub> = 0,38; detekce ninhydrin. Katex: gradientová eluční soustava – MeOH → H<sub>2</sub>O → 15 % NH<sub>3</sub>.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.73$  (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 3.51 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.92 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.86 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 1.59 (s, 5 H,  $2 \times \text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ).

### 3,6,13,16-Tetraoxa-9,10-dithiaoktadekan-1,18-diamin ( $n = 2$ ) (**10b**)

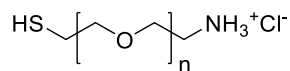
Postupem **OP6** byl z diazidu **9b** (40 mg; 0,20 mmol) získán diamin **10b** (16 mg; 0,10 mmol; 46 %) ve formě lehce nažloutlé gelovité látky. TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % NH<sub>3</sub> = 5/2/2/1; R<sub>f</sub> = 0,22; detekce ninhydrin. Katex: gradientová eluční soustava – MeOH → H<sub>2</sub>O → 15 % NH<sub>3</sub>.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.74$  (t,  $J = 6.7$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 3.69 – 3.57 (m, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.51 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.89 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.85 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 1.77 (s, 4 H,  $2 \times \text{NH}_2$ ).

### 3,6,9,16,19,22-Hexaoxa-12,13-dithiatetrakosan-1,24-diamin ( $n = 3$ ) (**10c**)

Postupem **OP6** byl z diazidu **9c** (275 mg; 0,59 mmol) připraven diamin **10c** (86 mg; 0,20 mmol; 35 %) ve formě lehce nažloutlé gelovité látky. TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % NH<sub>3</sub> = 5/8/6/1; R<sub>f</sub> = 0,37; detekce ninhydrin. Katex: gradientová eluční soustava – MeOH → H<sub>2</sub>O → 15 % NH<sub>3</sub>.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.74$  (t,  $J = 6.7$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 3.69 – 3.62 (m, 8 H,  $4 \times \text{CH}_2$ ), 3.51 (t,  $J$

= 5.2 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.91 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.87 (t, *J* = 4.9 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 1.68 (s, 4 H, 2 × NH<sub>2</sub>). MS (ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 417,2. Pro C<sub>16</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> vypočteno 417,21.

### Staudingerova redukce azido-sulfanyl-oligoethylenglykolu – obecný postup (OP7)



Látky **11a-c** byly připraveny upraveným postupem podle literatury.<sup>121</sup> Roztok kyseliny chlorovodíkové (1 M; 4,2 ekv. HCl) byl 10 minut probubláván argonem, následně vystaven na 5 minut ultrazvuku a poté znovu 5 minut probublán argonem. Emulze takto degazovaného roztoku a azido-sulfanyl-oligoethylenglykolu (**8a-c**) (1 ekv.) byla za stálého míchání chlazená ledovou lázní na 0 °C a opatřena argonovou atmosférou. Předem připravený roztok trifenyfosfinu (1,2 ekv.) v diethyletheru (40 ekv.) byl krátce probublán argonem (2 minuty), vystaven ultrazvuku (1 minuta) a přikapán k vychlazené emulzi azido-sulfanyl-oligoethylenglykolu. Po ohřátí na pokojovou teplotu byla reakční směs míchána za laboratorní teploty přes noc (15 hodin). Po ukončení míchání byla odebrána vodná fáze, třikrát vytřepána s chloroformem (1:1) a odpařena na RVO. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC.

### 3-Oxapentan-1-sulfanyl-5-amonium chlorid (n = 1) (**11a**)

Postupem **OP7** byl z azido-thiolu (**8a**) (288 mg; 1,96 mmol) připraven amino-hydrochlorid (**11a**) (280 mg; 1,78 mmol; 90 %) ve formě bílých krystalů. TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % NH<sub>3</sub> = 5/8/6/1; R<sub>f</sub> = 0,40; detekce ninhydrin. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 3.79 (t, *J* = 5.1 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 3.71 (t, *J* = 6.1 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 3.24 (t, *J* = 5.1 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.77 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>) ppm. HRMS (ESI): [M]<sup>+</sup> = 122,0631. Pro kation C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>NOS<sup>+</sup> vypočteno 122,06.

### 3,6-Dioxaoktan-1-sulfanyl-8-amonium chlorid (n = 2) (**11b**)

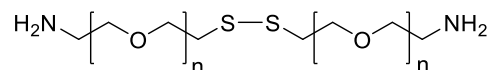
Postupem **OP7** byl z azido-thiolu (**8b**) (331 mg; 1,73 mmol) připraven amino-hydrochlorid (**11b**) (288 mg; 1,43 mmol; 83 %) ve formě nažloutlého gelu. TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % NH<sub>3</sub> = 5/8/6/1; R<sub>f</sub> = 0,55; detekce ninhydrin. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 3.83 – 3.67 (m, 8 H, 4 × CH<sub>2</sub>), 3.24 (t, *J* = 5.1 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>), 2.76 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H, 1 × CH<sub>2</sub>) ppm. HRMS (ESI): [M]<sup>+</sup> = 166,0893. Pro kation C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>S<sup>+</sup> vypočteno 166,09.

### 3,6,9-Trioxaundekan-1-sulfanyl-11-amonium chlorid (n = 3) (**11c**)

Postupem **OP7** byl z azido-thiolu (**8c**) (644 mg; 2,74 mmol) připraven amino-hydrochlorid (**11c**) (602 mg; 2,45 mmol; 89 %) ve formě nažloutlého gelu. TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % NH<sub>3</sub> = 5/8/6/1; R<sub>f</sub> = 0,61; detekce ninhydrin. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 3.83 – 3.66 (m, 12 H, 6 × CH<sub>2</sub>),

3.24 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ), 2.76 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2 H,  $1 \times \text{CH}_2$ ). HRMS (ESI):  $[\text{M}]^+ = 210,1153$ . Pro kation  $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{S}^+$  vypočteno 210,12.

### Oxidace sulfanyl-amonium chloridů na disulfid – obecný postup (OP8)



Sulfanyl-amonium-chlorid (**11a-c**) (1 ekv.) byl rozpuštěn ve 25%  $\text{NH}_3$  (40 ekv.  $\text{NH}_3$ ). Vzniklá směs byla pětkrát extrahována do chloroformu (1:1), organické fáze byly spojeny a odpařeny na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 60 ekv. methanolu a vystaven na 30 minut ultrazvuku. Směs byla zahuštěna na RVO a filtrována přes sloupec silikagelu.

### 3,10-Dioxa-6,7-dithiadodekan-1,12-diamin (**10a**)

Postupem **OP8** byl z amino-hydrochloridu (**11a**) (777 mg; 4,93 mmol) připraven diamin (**10a**) (428 mg; 1,73 mmol; 70 %) ve formě nažloutlého gelu. TLC – MeOH/25 %  $\text{NH}_3 = 20/1$ ;  $R_f = 0,24$ ; detekce ninhydrin. Filtrace – MeOH/ $\text{NH}_3 = 10/1$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 3.85$  (t,  $J = 6.0$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.62 (t,  $J = 5.4$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.98 (t,  $J = 6.0$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.85 (t,  $J = 5.4$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ) ppm.

### 3,6,13,16-Tetraoxa-9,10-dithiaoktadekan-1,18-diamin (**10b**)

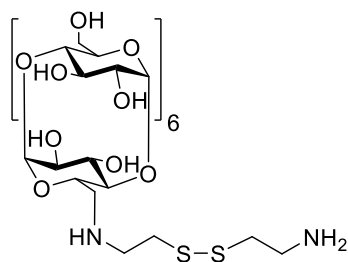
Postupem **OP8** byl z amino-hydrochloridu (**11b**) (233 mg; 1,16 mmol) připraven diamin (**10b**) (161 mg; 0,49 mmol; 84 %) ve formě nažloutlého gelu. TLC – MeOH/25 %  $\text{NH}_3 = 20/1$ ;  $R_f = 0,18$ ; detekce ninhydrin. Filtrace – MeOH/ $\text{NH}_3 = 10/1$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.74$  (t,  $J = 6.7$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.70 – 3.57 (m, 8 H,  $4 \times \text{CH}_2$ ), 3.52 (t,  $J = 5.2$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.90 (t,  $J = 6.7$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.87 (t,  $J = 5.4$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 1.66 (s, 4 H,  $2 \times \text{NH}_2$ ) ppm.

### 3,6,9,16,19,22-Hexaoxa-12,13-dithiatetrakosan-1,24-diamin (**10c**)

Postupem **OP8** byl z amino-hydrochloridu (**11b**) (602 mg; 2,45 mmol) připraven diamin (**10b**) (426 mg; 1,02 mmol; 83 %) ve formě nažloutlého gelu. TLC – MeOH/25 %  $\text{NH}_3 = 20/1$ ;  $R_f = 0,16$ ; detekce ninhydrin. Filtrace – MeOH/ $\text{NH}_3 = 10/1$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 3.85$  (t,  $J = 6.0$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.73 (d,  $J = 3.0$  Hz, 17 H,  $8 \times \text{CH}_2$ ), 3.62 (t,  $J = 5.4$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.98 (t,  $J = 6.0$  Hz, 4 H), 2.88 (t,  $J = 5.3$  Hz, 4 H,  $2 \times \text{CH}_2$ ) ppm.

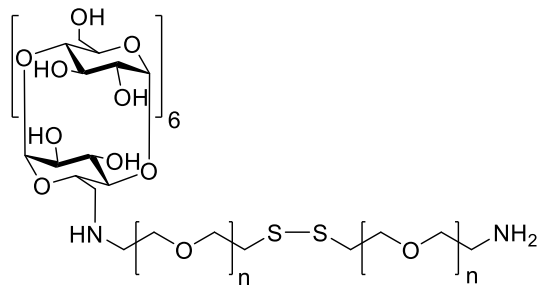


### 6'-((6-Amino-3,4-dithiahexan-1-yl)amino)-6'-deoxy- $\beta$ -CD (**3**)



Směs toluensulfonyl- $\beta$ -CD (**1**) (1,032 g; 0,80 mmol; 1 ekv.), cystaminu (**13**) (707 mg; 4,64 mmol; 5,8 ekv.) a 10,5 ml sušeného dimethylsulfoxidu byla 5 minut probublána argonem, opatřena septem a míchána 3 dny při 70 °C na olejové lázni. Po zchladnutí byla směs naředěna 10 ml eluční soustavy (BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O = 5/2/2) a ihned podrobena sloupcové chromatografii na silikagelu (gradientová eluční směs: BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O = 5/2/2 → 5/4/4 → 5/8/6). Tímto postupem byl získán  $\beta$ -CD-cystamin (**3**) (365 mg; 0,29 mmol; 35 %). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % HOAc = 5/8/6/0,5; R<sub>f</sub> = 0,18; detekce 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 5.79 – 5.65 (m, 15 H, 7  $\times$  OH-2, 7  $\times$  OH-3), 4.85 (m, 8 H, 6  $\times$  H-1, 1  $\times$  H-1'), 4.45 (m, 6  $\times$  OH-6), 3.65 – 3.60 (m, 20 H, 6  $\times$  H-3, 12  $\times$  H-6, 1  $\times$  H-2', 1  $\times$  H-3'), 3.60 – 3.53 (m, 7 H, 6  $\times$  H-4), 3.36 – 3.29 (m, 6  $\times$  H-5, 6  $\times$  H-2, 1  $\times$  H-4', 1  $\times$  H-5'), 2.95 – 2.73 (m, 10 H, 2  $\times$  H-6', 2  $\times$  H-1', 2  $\times$  H-2', 2  $\times$  H-3', 2  $\times$  H-4') ppm. MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> = 1269,4. C<sub>46</sub>H<sub>81</sub>N<sub>2</sub>O<sub>34</sub>S<sub>2</sub> vypočteno 1269,40.

### Vazba diamin-dithia-oligoethylenglykolu (**10a-c**) na tosyl- $\beta$ -CD – obecný postup (OP9)



Tosyl- $\beta$ -CD (**1**) (1 ekv.) a oligoethylenglykolový derivát **10a-c** (5 ekv.) byly suspendovány ve vodě (700 ekv.). Směs byla míchána při 70 °C přes noc (20 hodin). Po ukončení míchání a zchladnutí směsi byl přidán nadbytek vody (2:1) a 25% roztok NH<sub>3</sub> (60 ekv. NH<sub>3</sub>). Směs byla šestkrát extrahována chloroformem (1:1) a vodná fáze odpařena na RVO. Produkt byl separován od ostatních složek směsi pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu gradientovou eluční soustavou. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC.

### 6'-((12-Amino-3,10-dioxa-6,7-dithiadodekan-1-yl)amino)-6'-deoxy- $\beta$ -CD (n=1) (**4a**)

Postupem **OP9** byl z tosyl- $\beta$ -CD (**1**) (22 mg; 0,017 mmol) a diethylenglykolového derivátu **10a** (20 mg; 0,8 mmol) připraven derivát (**4a**) (15 mg; 0,011 mmol; 66 %) ve formě bílé krystalické

látky. TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % HOAc = 5/8/6/0,5; R<sub>f</sub> = 0,2; detekce 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sloupcová chromatografie – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % HOAc = 5/2/2/0 → 5/4/4/0 → 5/8/6/0 → 5/8/6/1). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 5.17 – 5.03 (m, 7H, 6 × H-1, 1 × H-1<sup>l</sup>), 4.22 (t, J = 10.4 Hz, 1H, 1 × H-3<sup>l</sup>), 4.10 – 3.77 (m, 6 × H-3, 6 × H-4, 12 × H-6, 1 × H-2<sup>l</sup>, 2 × H-3', 2 × H-6'), 3.77 – 3.55 (m, 6 × H-2, 6 × H-5, 1 × H-4<sup>l</sup>), 3.47 (t, 1 × H-5<sup>l</sup>), 3.29 (1 × CH<sub>2</sub>), 3.24 (1 × CH<sub>2</sub>), 3.13 (m, 2 × H-4', 2 × H-5', 2 × H-8'), 2.95 (d, J = 39.1 Hz, 2H), 2.77 (d, J = 14.0 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 102.5 (C-1, C-1<sup>l</sup>), 84.0 (C-5<sup>l</sup>), 81.5 (C-5), 73.2 (C-3), 73.0 (C-2<sup>l</sup>, C-4<sup>l</sup>), 72.2 (C-2, C-4), 70.2 (CH<sub>2</sub>), 69.5 (CH<sub>2</sub>), 68.5 (C-3', C-6'), 67.5 (C-3<sup>l</sup>), 60.1 (C-6), 39.6 (CH<sub>2</sub>), 39.2 (CH<sub>2</sub>), 37.0 (C-1', C-6<sup>l</sup>) ppm. HRMS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> = 1357,4651. C<sub>50</sub>H<sub>89</sub>N<sub>2</sub>O<sub>36</sub>S<sub>2</sub> vypočteno 1357,46.

#### 6<sup>l</sup>-((18-Amino-3,6,13,16-tetraoxa-9,10-dithiaoktadekan-1-yl)amino)-6<sup>l</sup>-deoxy-β-CD (n=2) (4b)

Postupem **OP9** byl z tosyl-β-CD (**1**) (24 mg; 0,019 mmol) a triethylenglykolového derivátu **10b** (29 mg; 0,9 mmol) připraven derivát (**4b**) (18 mg; 0,012 mmol; 67 %) ve formě bílé krystalické látky. TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % HOAc = 5/8/6/0,5; R<sub>f</sub> = 0,23; detekce 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sloupcová chromatografie – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % HOAc = 5/2/2/0 → 5/4/4/0 → 5/8/6/0 → 5/8/6/1). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 5.17 – 5.03 (m, 7H, 1 × H-2<sup>l</sup>, 1 × H-2<sup>l</sup>), 4.17 (t, J = 9.6 Hz, 1H, 1 × H-2<sup>l</sup>), 4.02 – 3.84 (m, 6 × H-3<sup>l</sup>, 12 × H-6, 1 × H-2<sup>l</sup>, 2 × H-5', 2 × H-8'), 3.84 – 3.74 (m, 6 × H-4, 4 × CH<sub>2</sub>), 3.74 – 3.66 (m, 6 × H-2, 1 × H-4<sup>l</sup>, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.66 – 3.57 (m, 6 × H-5), 3.54 (t, 1 × H-5<sup>l</sup>), 3.31 (t, J = 11.2 Hz, 2 × H-12'), 3.28 – 3.18 (m, 2 × H-6', 2 × H-7'), 2.97 (d, J = 6.2 Hz, 2 H, 2 × H-1'), 2.88 (d, J = 6.2 Hz, 2 H, 2 × H-6<sup>l</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 102.61 – 101.76 (C-1, C-1<sup>l</sup>), 83.61 (C-5<sup>l</sup>), 81.69 – 80.81 (C-5), 73.74 – 73.19 (C-3), 72.99 (C-2<sup>l</sup>, C-4<sup>l</sup>), 72.40 – 71.52 (C-2, C-4), 70.20 (m, CH<sub>2</sub>), 69.50 (m, CH<sub>2</sub>), 68.29 (C-5', C-8'), 67.75 (C-3<sup>l</sup>), 66.58, 64.51, 59.96 (C-6), 39.18 (C-6', C-7'), 37.53 (C-6<sup>l</sup>), 36.80 (C-1') ppm. HRMS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> = 1445,5158. C<sub>54</sub>H<sub>76</sub>N<sub>2</sub>O<sub>38</sub>S<sub>2</sub> vypočteno 1445,51.

#### 6<sup>l</sup>-((24-Amino-3,6,9,16,19,22-hexaoxa-12,13-dithiatetrakosan-1-yl)amino)-6<sup>l</sup>-deoxy-β-CD (n=3) (4c)

Postupem **OP9** byl z tosyl-β-CD (**1**) (26 mg; 0,020 mmol) a tetraethylenglykolového derivátu **10c** (41 mg; 0,10 mmol) připraven derivát (**4c**) (27 mg; 0,017 mmol; 85 %) ve formě bílé krystalické látky. TLC – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % HOAc = 5/8/6/0,5; R<sub>f</sub> = 0,19; detekce 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sloupcová chromatografie – BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/25 % HOAc = 5/2/2/0 → 5/4/4/0 → 5/8/6/0 → 5/8/6/1). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 5.18 – 5.02 (m, 7H, 6 × H-1, 1 × H-1<sup>l</sup>), 4.12 (t, J = 10.0 Hz, 1 H, 1 × H-3<sup>l</sup>), 4.03 – 3.81 (m, 6 × H-3, 12 × H-6, 1 × H-2<sup>l</sup>, 2 × H-7', 2 × H-10'), 3.81 – 3.75 (m, 6 × H-4<sup>l</sup>), 3.75 – 3.65 (m, 6 × H-2, 1 × H-4<sup>l</sup>, 2 × H-2', 2 × H-3', 2 × H-4', 2 × H-5', 2 × H-6', 2 × H-10', 2 × H-11', 2 × H-12', 2 × H-13', 2 × H-14', 2 × H-15'), 3.65 – 3.55 (m, 6 × H-5), 3.51 (t, J = 9.3 Hz, 1 H, 1 × H-5<sup>l</sup>), 3.38 (t, J = 14.2 Hz, 2 × H-16'), 3.28 – 3.17 (m, 4 H, 2 × H-8', 2 × H-9'), 3.00 (t, J = 6.1 Hz, 2 H,

1 × H-1'), 2.90 (t, J = 5.7 Hz, 2 H, 1 × H-6<sup>l</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 102.90 – 101.06 (C-1, C-1<sup>l</sup>), 83.48 (C-5<sup>l</sup>), 81.93 – 80.28 (C-5), 73.29 (C-3), 72.65 – 71.78 (C-2, C-4, C-2<sup>l</sup>, C-4<sup>l</sup>), 70.52 – 68.94 (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-7', C-10', C-11', C-12', C-13', C-14', C-15'), 66.39 (C-3<sup>l</sup>), 60.65 – 59.23 (C-6), 48.51 (C-16'), 39.12 (C-8', C-9'), 36.88 (C-1', C-2<sup>l</sup>) ppm. HRMS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> = 1533,5603. Pro C<sub>58</sub>H<sub>105</sub>N<sub>2</sub>O<sub>40</sub>S<sub>2</sub> vypočteno 1533,56.

## 6.2 Molekulová dynamika

Všechny simulace byly realizovány programem NAMD<sup>112</sup> za použití vodní obálky a periodických okrajových podmínek. Ve všech provedených simulacích byla zafixována délka vazeb s účastí atomu vodíku. Elektrostatické síly byly počítány pomocí Ewaldovy sumace s hustotou mřížky 1 Å. Pro kontrolu teploty a tlaku byla použita Langevin-Hooverova dynamika. Při alchymistických simulacích byla použita délka časového kroku 1 fs. Nevazebné interakce byly počítány v každém druhém a elektrostatické interakce v každém čtvrtém kroku. Van der Waalsovy síly byly započítány pouze do vzdálenosti atomů 11 Å. U všech ostatních simulací byl použit časový krok 2 fs, nevazebné interakce byly počítány v každém a elektrostatické interakce v každém druhém kroku. Van der Waalsovy síly byly započítány do vzdálenosti atomů 12 Å.

Pro získání parametrů silového pole pro všechny organické molekuly byl použit webový server ParamChem.<sup>125,126,127,128</sup> Parametry skleněného fragmentu byly získány z literatury.<sup>132</sup> Pro vodní obálku a anorganické ionty bylo použito silové pole CHARMM36<sup>126</sup> v rámci programu VMD<sup>130</sup>, pomocí kterého byla vodní obálka vygenerována.

Všechny krystalové struktury byly získány s Cambridgeské krystalografické databáze (CSD).<sup>133</sup>

U názvu každého ligandu je uveden odkaz na literaturu, ve které je použitá struktura publikována, pokud nebyla získána jinak. Pro  $\beta$ -CD byla použita vždy stejná krystalová struktura.<sup>12</sup> Molekuly fenolu, fenylalaninu a akrylodanu byly postaveny pomocí modulu MoleFactory v programu VMD<sup>130</sup> a jejich geometrie byla optimalizována za použití semi-empirického kvantově mechanického plug-inu SQM.

### 6.2.1 Inkluze ligandů do $\beta$ -CD

Pro simulaci inkluze molekul bylo uvedeno výše uvedené nastavení. Všechny ostatní charakteristiky simulací budou dále uvedeny v tabulkách 4-8 nadepsaných názvy jednotlivých ligandů.

**Tabulka 4 – Hydrocinamát<sup>138</sup>**

Č.	Objem vodní obálky ( $\times 10^3 \text{ Å}^3$ )	Délka simulace (ps)	Čas, po kterém se ligand dostal do kavity (ps)
1	54,3	10 000	16
2	89,1	10 000	20
3	99,2	10 000	5 280

4	91,3	10 000	920
5	97,4	10 000	-
6	78,1	4 000	-
7	98,1	4 000	60
8	98,1	4 000	-
9	99,1	4 000	-

**Tabulka 5 – Fenol**

Č.	Objem vodní obálky ( $\times 10^3 \text{ Å}^3$ )	Délka simulace (ps)	Čas, po kterém se ligand dostal do kavity (ps)
1	35,4	5	*
2	35,4	200	8
3	35,4	50 000	**

\*orientační simulace, která byla velmi krátká a proto se molekula nestihla inkludovat

\*\*dlouhá simulace, která vyžadovala nízkou frekvenci pořizovaných snímků, takže v prvním snímku byla molekula již inkludována

**Tabulka 6 – Fenylalanin**

Č.	Objem vodní obálky ( $\times 10^3 \text{ Å}^3$ )	Délka simulace (ps)	Čas, po kterém se ligand dostal do kavity (ps)
1*	56,6	100	18
2*	56,6	200	9
3**	56,6	100	37
4**	56,6	200	47

\* molekula se skupinami bez náboje

\*\*zwitteriontová forma

**Tabulka 7 – Akrylodan**

Č.	Objem vodní obálky ( $\times 10^3 \text{ Å}^3$ )	Délka simulace (ps)	Čas, po kterém se ligand dostal do kavity (ps)
1	95,2	600	206
2	124,4	1 000	--

3	89,1	1 000	--
4	103,4	1 000	--
5	109,1	1 000	--
6	110,1	1 000	--

**Tabulka 8 – Fenethylamin<sup>139</sup>**

Č.	Objem vodní obálky ( $\times 10^3 \text{ Å}^3$ )	Délka simulace (ps)	Čas, po kterém se ligand dostal do kavity (ps)
1	88,1	4 000	--

### 6.2.2 Výpočet relativní vazebné energie

Podmínky výpočtů relativních vazebných energií jsoupecifikované v kapitole (6.2). Dále budou uvedeny výsledné hodnoty všech dopředných (f) i zpětných (b) běhů alchymistických výpočtů a to jednak uvnitř kavity  $\beta$ -CD a jednak pouze ve vodní obálce (aq) (tabulka 9). Průměrná vypočítaná hodnota je označena  $\Delta G_{b,rel}^{TEOR}$ , směrodatná odchylka je vypočtena pomocí programu Microsoft Excel podle standardního vzorce.<sup>140</sup> Struktury všech molekul byly získány z CSD<sup>133</sup> (hydrocinamát,<sup>138</sup> fenethylamin,<sup>139</sup> fenpropylamin,<sup>141</sup> benzylpiperidin,<sup>142</sup> thyramin).

**Tabulka 9 – Vypočtené hodnoty relativní vazebné energie  $\Delta G_{b,rel}^{TEOR}$  (kJ/mol) ze všech alchymistických běhů.**

Číslo běhu	$\Delta G_{b,rel}^{cin \rightarrow pea}$ (kJ/mol)				$\Delta G_{b,rel}^{pea \rightarrow pbi}$ (kJ/mol)			
	aq		$\beta$ -CD		aq		$\beta$ -CD	
	f	b	f	b	f	b	f	b
1	77,346	-76,352	83,439	-79,567	18,540	-19,826	17,161	-18,380
2	78,699	-78,268	82,742	-79,622	23,270	-21,896	26,862	-23,318
3	79,255	-77,721	82,123	-77,760	24,035	-21,514	11,093	-13,070
4	83,012	-75,457	79,307	-78,336	24,325	-23,738	23,519	-19,325
5	79,403	-74,019	83,785	-79,459	29,505	-31,270	19,025	-13,427
6					29,910	-29,555	18,469	-9,200
7					31,008	-31,095	13,263	-13,653

8	22,494	-23,248	15,892	-9,569
9	22,494	-23,248	18,004	-14,880
10	28,980	-28,415	24,023	-20,713

$$\Delta G_{b,rel}^{TEOR} -2,66066 \pm 2,72$$

$$\Delta G_{b,rel}^{TEOR} 8,276103 \pm 6,73$$

Číslo běhu	$\Delta G_{b,rel}^{pea \rightarrow ppa}$ (kJ/mol)				$\Delta G_{b,rel}^{pea \rightarrow tya}$ (kJ/mol)			
	aq		$\beta$ -CD		aq		$\beta$ -CD	
	f	b	f	b	f	b	f	b
1	62,092	61,840	57,142	57,069	-88,337	88,013	-96,093	97,031
2	60,882	60,051	59,471	60,276	-87,593	87,884	-91,886	95,365
3	60,793	61,084	57,310	55,411	-87,962	88,078	-97,044	95,320
4	60,466	60,796	62,109	61,029	-87,951	88,240	-96,755	95,926
5	61,860	61,666	57,721	57,516	-87,642	88,434	-94,851	95,293
6	62,339	62,610	60,495	58,707	-87,878	88,026	-92,386	95,567
7	60,336	61,206	60,052	55,023	-88,156	88,117	-94,655	95,999
8	61,751	58,902	60,481	55,683	-88,513	88,316	-97,601	97,177
9	61,327	59,698	60,213	56,319	-87,487	87,652	-96,284	93,168
10	60,592	58,972	59,411	59,581	-87,940	88,331	-97,479	

$$\Delta G_{b,rel}^{TEOR} 2,412067 \pm 2,21$$

$$\Delta G_{b,rel}^{TEOR} 7,545015 \pm 1,48$$

### 6.2.3 Simulace cílových derivátů $\beta$ -CD

Pro sérii simulací cílových derivátů 3 a 4a-c byly použity výše specifikované podmínky (6.2). V tabulce 10 jsou uvedeny další charakteristiky jednotlivých běhů výpočtů.

**Tabulka 10 – Charakteristiky simulací cílových derivátů 3 a 4a-c.**

Č.	Ozn. molekuly	Objem vodní obálky ( $\times 10^3 \text{ \AA}^3$ )	Délka simulace (ps)
1	<b>3</b>	94,2	200
2	<b>3</b>	94,2	600
3	<b>4a</b>	109,4	1 000
4	<b>4a</b>	109,4	10 000

5	<b>4a</b>	109,4	20 000
6	<b>4b</b>	137,8	1 000
7	<b>4b</b>	137,8	10 000
8	<b>4b</b>	137,8	20 000
9	<b>4c</b>	140,4	1 000
10	<b>4c</b>	140,4	10 000
11	<b>4c</b>	140,4	20 000

#### 6.2.4 Simulace konjugátu $\beta$ -CD – sklo – akrylodan

Pro  $\beta$ -CD – sklo – akrylodan byly použity výše specifikované podmínky (6.2). V tabulce 11 jsou uvedeny další charakteristiky jednotlivých běhů výpočtů. Pro vytvoření modelu byl použit modul MoleFacture v programu VMD<sup>130</sup>

**Tabulka 11 – Charakteristiky simulací konjugátu  $\beta$ -CD – sklo – akrylodan.**

Č.	Objem vodní obálky ( $\times 10^3 \text{ \AA}^3$ )	Délka simulace (ps)
1	424,6	20
2	424,6	2 000
3	424,6	20 000



## Použitá literatura

- (1) Crini, G. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (21), 10940–10975.
- (2) Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, 39 (9), 1033–1046.
- (3) Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (5), 1997–2012.
- (4) del Castillo, T.; Marales-Sanfrutos, J.; Santoyo-González, F.; Magez, S.; Lopez-Jaramillo, F. J.; Garcia-Salcedo, J. A. *ChemMedChem* **2014**, 9 (2), 383–389.
- (5) Anirudhan, T. S.; Divya, P. L.; Nima, J. *Chem. Eng. J.* **2016**, 284, 1259–1269.
- (6) Mamba, B. B.; Krause, R. W.; Malefetse, T. J.; Nxumalo, E. N. *Environ. Chem. Lett.* **2006**, 5 (2), 79–84.
- (7) Ogoshi, T.; Harada, A. *SENSORS* **2008**, 8 (8), 4961–4982.
- (8) Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 59 (6), 609–617.
- (9) Uitdehaag, J. C. M.; Kalk, K. H.; van der Veen, B. A.; Dijkhuizen, L.; Dijkstra, B. W. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (49), 34868–34876.
- (10) Uitdehaag, J. C. M.; van der Veen, B. A.; Dijkhuizen, L.; Dijkstra, B. W. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 30 (3), 295–304.
- (11) McNaught, A. D. *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68 (10).
- (12) Ramos, A. I.; Braga, T. M.; Silva, P.; Fernandes, J. A.; Ribeiro-Claro, P.; Lopes, M. de F. S.; Paz, F. A. A.; Braga, S. S. *CrystEngComm* **2013**, 15 (15), 2822.
- (13) Koolman, J.; Röhm, K.-H. *Color atlas of biochemistry*, 3rd ed., and updated.; Thieme flexibooks; Thieme: Stuttgart, 2013.
- (14) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (5), 1875–1918.
- (15) Liu, L.; Guo, Q.-X. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, 42 (1), 1–14.
- (16) Szejtli, J. *Chem Rev* **1998**, 98 (5), 1743–1754.
- (17) Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, 97 (5), 1325–1358.
- (18) Kano, K.; Nishiyabu, R.; Asada, T.; Kuroda, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (33), 9937–9944.
- (19) Higashi, T.; Li, J.; Song, X.; Zhu, J.; Taniyoshi, M.; Hirayama, F.; Iohara, D.; Motoyama, K.; Arima, H. *ACS Macro Lett.* **2016**, 5 (2), 158–162.
- (20) Iijima, K.; Aoki, D.; Sogawa, H.; Asai, S.; Takata, T. *Polym Chem* **2016**, 7 (21), 3492–3495.
- (21) Eftink, M. R.; Andy, M. L.; Bystrom, K.; Perlmutter, H. D.; Kristol, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111 (17), 6765–6772.
- (22) Hussain, M. A.; Diluccio, R. C.; Maurin, M. B. *J. Pharm. Sci.* **1993**, 82 (1), 77–79.
- (23) Másson, M.; Loftsson, T.; Jónsdóttir, S.; Fridriksdóttir, H.; Petersen, D. S. *Int. J. Pharm.* **1998**, 164 (1–2), 45–55.
- (24) Tanabe, T.; Touma, K.; Hamasaki, K.; Ueno, A. *Anal. Chem.* **2001**, 73 (13), 3126–3130.

- (25) Becuwe, M.; Danjou, P.-E.; Cazier, F.; Woisel, P.; Delattre, F. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *450*, 62–67.
- (26) Ueno, A. *Supramol. Sci.* **1996**, *3* (1–3), 31–36.
- (27) Nelissen, H. F. M.; Venema, F.; Uittenbogaard, R. M.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, No. 10, 2045–2053.
- (28) Bügler, J.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (16), 5339–5344.
- (29) Yang, R.; Li, K. 'an; Wang, K.; Zhao, F.; Li, N.; Liu, F. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (3), 612–621.
- (30) Hossain, M. A.; Hamasaki, K.; Takahashi, K.; Mihara, H.; Ueno, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (30), 7435–7436.
- (31) Corradini, R.; Dossena, A.; Galaverna, G.; Marchelli, R.; Panagia, A.; Sartor, G. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (18), 6283–6289.
- (32) Takenaka, Y.; Higashi, M.; Yoshida, N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, No. 3, 615–620.
- (33) Sun, X.; Wang, Y.; Lei, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (22), 8019–8061.
- (34) Wood, D. J.; Hruska, F. E.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (6), 1735–1740.
- (35) Béni, S.; Szakács, Z.; Csernák, O.; Barcza, L.; Noszál, B. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *30* (2), 167–174.
- (36) Churchill, D.; Cheung, J. C. F.; Park, Y. S.; Smith, V. H.; vanLoon, G.; Buncel, E. *Can. J. Chem.* **2006**, *84* (4), 702–708.
- (37) Bouchemal, K.; Mazzaferro, S. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (11–12), 623–629.
- (38) Suzuki, M.; Ito, K.; Fushimi, C.; Kondo, T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1993**, *41* (9), 1616–1620.
- (39) Lipkowitz, K. B. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1829–1874.
- (40) F. Gibbs, Selim Kermasha, Inteaz Al, B. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **1999**, *50* (3), 213–224.
- (41) Buschmann, H.-J.; Schollmeyer, E. *J. Cosmet. Sci.* **2002**, *53* (3), 185–191.
- (42) Loftsson, T.; Brewster, M. E. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (10), 1017–1025.
- (43) Loftsson, T.; Duchêne, D. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329* (1–2), 1–11.
- (44) Li, S.; Purdy, W. C. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (6), 1457–1470.
- (45) Szejtli, J. *Starch - Stärke* **2003**, *55* (5), 191–196.
- (46) Peterson, L. G.; LaFleur, P. A. Methods and compositions for reducing body odor. US 5780020 A, 1998.
- (47) Chiu, S.-H.; Chung, T.-W.; Giridhar, R.; Wu, W.-T. *Food Res. Int.* **2004**, *37* (3), 217–223.
- (48) Ward, T. J.; Ward, K. D. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (2), 626–635.
- (49) Armstrong, D. W.; Tang, Y.; Ward, T.; Nichols, M. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (8), 1114–1117.
- (50) Kawaguchi, Y.; Tanaka, M.; Nakae, M.; Funazo, K.; Shono, T. *Anal. Chem.* **1983**, *55* (12), 1852–1857.
- (51) Zhang, Z.; Wu, M.; Wu, R.; Dong, J.; Ou, J.; Zou, H. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (9), 3616–3622.

- (52) Varga, G.; Tárkányi, G.; Németh, K.; Iványi, R.; Jicsinszky, L.; Tőke, O.; Visy, J.; Szente, L.; Szemán, J.; Simonyi, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51* (1), 84–89.
- (53) Lai, X.; Tang, W.; Ng, S.-C. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (22), 3496–3501.
- (54) Németh, K.; Varga, E.; Iványi, R.; Szemán, J.; Visy, J.; Jicsinszky, L.; Szente, L.; Forró, E.; Fülöp, F.; Péter, A.; Simonyi, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53* (3), 382–388.
- (55) Rousseau, A.; Gillotin, F.; Chiap, P.; Crommen, J.; Fillet, M.; Servais, A.-C. *ELECTROPHORESIS* **2010**, *31* (9), 1482–1487.
- (56) Viglianti, C.; Hanna, K.; de Brauer, C.; Germain, P. *Environ. Pollut.* **2006**, *140* (3), 427–435.
- (57) Butterfield, M. T.; Agbaria, R. A.; Warner, I. M. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (7), 1187–1190.
- (58) Nelles, G.; Weisser, M.; Back, R.; Wohlfart, P.; Wenz, G.; Mittler-Neher, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (21), 5039–5046.
- (59) Shahgaldian, P.; Pieleś, U. *Sensors* **2006**, *6* (6), 593–615.
- (60) Onclin, S.; Mulder, A.; Huskens, J.; Ravoo, B. J.; Reinhoudt, D. N. *Langmuir* **2004**, *20* (13), 5460–5466.
- (61) Casu, B.; Reggiani, M.; Gallo, G. G.; Vigevari, A. *Tetrahedron* **1968**, *24* (2), 803–821.
- (62) Takeo, K.; Ueraura, K.; Mitoh, H. *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7* (2), 293–308.
- (63) Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D’Souza, V. T. *Chem Rev* **1998**, *98* (5), 1977–1996.
- (64) May, B. L.; Kean, S. D.; Easton, C. J.; Lincoln, S. F. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1997**, No. 21, 3157–3160.
- (65) Tang, W.; Ng, S. C. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31* (18), 3246–3256.
- (66) Zhao, Y.; Liu, Y. *Sci. China Ser. B* **49** (3), 230–237.
- (67) Cravotto, G.; Caporaso, M.; Jicsinszky, L.; Martina, K. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 278–294.
- (68) Kurochkina, G. I.; Kudryavtseva, N. A.; Grachev, M. K.; Lysenko, S. A.; Vasyanina, L. K.; Nifant’ev, E. *Russ. J. Gen. Chem.* **77** (3), 442–449.
- (69) Fujita, K.; Nagamura, S.; Imoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25* (49), 5673–5676.
- (70) Ashton, P. R.; Ellwood, P.; Staton, I.; Stoddart, J. F. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (26), 7274–7280.
- (71) Popr, M.; Hybelbauerová, S.; Jindřich, J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1390–1396.
- (72) Villalonga, R.; Cao, R.; Fragoso, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (7), 3088–3116.
- (73) Weisser, M.; Nelles, G.; Wohlfart, P.; Wenz, G.; Mittler-Neher, S. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (45), 17893–17900.
- (74) Weisser, M.; Nelles, G.; Wenz, G.; Mittler-Neher, S. *Sens. Actuators B Chem.* **1997**, *38* (1–3), 58–67.
- (75) Maeda, Y.; Fukuda, T.; Yamamoto, H.; Kitano, H. *Langmuir* **1997**, *13* (16), 4187–4189.
- (76) Palaniappan, A.; Li, X.; Tay, F. E. H.; Li, J.; Su, X. *Sens. Actuators B Chem.* **2006**, *119* (1), 220–226.
- (77) Fuhrer, R.; Herrmann, I. K.; Athanassiou, E. K.; Grass, R. N.; Stark, W. J. *Langmuir* **2011**, *27* (5), 1924–1929.

- (78) Tamagaki, S.; Katayama, A.; Maeda, M.; Yamamoto, N.; Tagaki, W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, No. 3, 507–511.
- (79) Banerjee, I. A.; Yu, L.; Matsui, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (32), 9542–9543.
- (80) Bednářová, E. Příprava derivátů cyklodextrinů použitelných pro modifikace pevných povrchů, Univerzita Karlova v Praze, 2014.
- (81) Wang, Y.; Li, H.; Jin, Q.; Ji, J. *Chem Commun* **2016**, *52* (3), 582–585.
- (82) Feng, A.; Yan, Q.; Zhang, H.; Peng, L.; Yuan, J. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (36), 4740–4742.
- (83) Bulat, A. D.; Grishin, V. V.; Kuznetsova, T. E.; Nekrasov, S. V.; Passet, B. V. *Pharm. Chem. J.* **24** (5), 376–378.
- (84) Cleland, W. W. *Biochemistry (Mosc.)* **1964**, *3* (4), 480–482.
- (85) Li, L.; Li, X.; Liu, Y. *Chin. Sci. Bull.* **49** (2), 115–118.
- (86) Liu, Y.; Li, X.-Y.; Guo, D.-S.; Chi, H. *Supramol. Chem.* **2008**, *20* (7), 609–617.
- (87) Zhang, L.; Wu, Y.; Brunsveld, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (11), 1798–1802.
- (88) Chen, L.-X.; Zhang, Y.-M.; Cao, Y.; Zhang, H.-Y.; Liu, Y. *RSC Adv* **2016**, *6* (34), 28593–28598.
- (89) Liu, Y.; Yang, Y.-W.; Yang, E.-C.; Guan, X.-D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (20), 6590–6602.
- (90) Zhang, Q.; Li, G.-Z.; Becer, C. R.; Haddleton, D. M. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (65), 8063.
- (91) Hu, X.; Tan, H.; Wang, X.; Chen, P. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, *489*, 297–304.
- (92) Bonollo, S.; Lanari, D.; Vaccaro, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011* (14), 2587–2598.
- (93) McFarland, S. A.; Finney, N. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (6), 1260–1261.
- (94) Carr, P. W. *Microchem. J.* **1993**, *48* (1), 4–28.
- (95) Cheng, Y.; Jiang, P.; Lin, S.; Li, Y.; Dong, X. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *193*, 838–843.
- (96) Serio, N.; Miller, K.; Levine, M. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (42), 4821.
- (97) Valeur, B. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205* (1), 3–40.
- (98) Higgs, P. L.; McKinley, A. W.; Tuite, E. M. *Chem Commun* **2016**, *52* (9), 1883–1886.
- (99) Purkayastha, P. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2010**, *212* (1), 43–48.
- (100) Feng, L.; Tong, C.; He, Y.; Liu, B.; Wang, C.; Sha, J.; Lü, C. *J. Lumin.* **2014**, *146*, 502–507.
- (101) Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94* (8), 2319–2358.
- (102) Dong, Y.; Bolduc, A.; McGregor, N.; Skene, W. G. *Org. Lett.* **2011**, *13* (7), 1844–1847.
- (103) Banerjee, A.; Sengupta, B.; Chaudhuri, S.; Basu, K.; Sengupta, P. K. *J. Mol. Struct.* **2006**, *794* (1–3), 181–189.
- (104) Baker, G. A.; Crane, N. J.; Mayrhofer, R. C.; Betts, T. A. *J. Chem. Educ.* **2002**, *79* (10), 1261.
- (105) Catena, G. C.; Bright, F. V. *Anal. Chem.* **1989**, *61* (8), 905–909.
- (106) Zheng, Q.; Juette, M. F.; Jockusch, S.; Wasserman, M. R.; Zhou, Z.; Altman, R. B.; Blanchard, S. C. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (4), 1044–1056.

- (107) Altman, R. B.; Terry, D. S.; Zhou, Z.; Zheng, Q.; Geggier, P.; Kolster, R. A.; Zhao, Y.; Javitch, J. A.; Warren, J. D.; Blanchard, S. C. *Nat. Methods* **2012**, *9* (1), 68–71.
- (108) Altman, R. B.; Zheng, Q.; Zhou, Z.; Terry, D. S.; Warren, J. D.; Blanchard, S. C. *Nat. Methods* **2012**, *9* (5), 428–429.
- (109) Lin, H.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *117* (2), 185.
- (110) Tomasi, J. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, *112* (4), 184–203.
- (111) *Molecular Dynamics*; Lecture Notes in Physics; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 1986; Vol. 258.
- (112) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1781–1802.
- (113) Boukharta, L.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Åqvist, J. *PLOS Comput Biol* **2014**, *10* (4), e1003585.
- (114) Straatsma, T. P.; McCammon, J. A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43* (1), 407–435.
- (115) *Free energy calculations: theory and applications in chemistry and biology*; Chipot, C., Pohorille, A., Eds.; Springer series in chemical physics; Springer: Berlin ; New York, 2007.
- (116) Cai, W.; Sun, T.; Liu, P.; Chipot, C.; Shao, X. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (22), 7836–7843.
- (117) Mieda, S.; Ikeda, A.; Shigeri, Y.; Shinoda, W. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (23), 12555–12561.
- (118) He, J.; Chipot, C.; Shao, X.; Cai, W. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (41), 24173–24180.
- (119) Bednářová, E.; Hybelbauerová, S.; Jindřich, J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 349–352.
- (120) García Ruano, J. L.; Parra, A.; Alemán, J. *Green Chem.* **2008**, *10* (6), 706.
- (121) Hadzima, M. Fluorescenčně značené ligandy  $\mu$ -opioidních receptorů, Univerzita Karlova v Praze, 2016.
- (122) Yeo, W.-S.; Min, D.-H.; Hsieh, R. W.; Greene, G. L.; Mrksich, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (34), 5480–5483.
- (123) Yamamoto, Y.; Hasegawa, J.; Ito, Y. *J. Phys. Org. Chem.* **2012**, *25* (3), 239–247.
- (124) Parker, A. J.; Kharasch, N. *Chem. Rev.* **1959**, *59* (4), 583–628.
- (125) Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (12), 3144–3154.
- (126) Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (4), 671–690.
- (127) Vanommeslaeghe, K.; Raman, E. P.; MacKerell, A. D. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (12), 3155–3168.
- (128) Yu, W.; He, X.; Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33* (31), 2451–2468.
- (129) Lopes, P. E. M.; Murashov, V.; Tazi, M.; Demchuk, E.; MacKerell, A. D. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (6), 2782–2792.
- (130) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33–38, 27–28.
- (131) Rekharsky, M. V.; Goldberg, R. N.; Schwarz, F. P.; Tewari, Y. B.; Ross, P. D.; Yamashoji, Y.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (34), 8830–8840.

- (132) Fujiyama, S.; Seino, S.; Kamiya, N.; Nishi, K.; Yoza, K.; Yokomori, Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (30), 15839.
- (133) Groom, C. R.; Bruno, I. J.; Lightfoot, M. P.; Ward, S. C. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2016**, *72* (2), 171–179.
- (134) Bongers, K. M.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Heitman, L. H.; IJzerman, A. P.; Oosterom, J.; Timmers, C. M.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (14), 4841–4856.
- (135) Meunier, S. J.; Wu, Q.; Wang, S.-N.; Roy, R. *Can. J. Chem.* **1997**, *75* (11), 1472–1482.
- (136) Borchmann, D. E.; ten Brummelhuis, N.; Weck, M. *Macromolecules* **2013**, *46* (11), 4426–4431.
- (137) Parker, C. G.; Domaoal, R. A.; Anderson, K. S.; Spiegel, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (45), 16392–16394.
- (138) Trivedi, D. R.; Ballabh, A.; Dastidar, P.; Ganguly, B. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10* (21), 5311–5322.
- (139) Hlel, F.; Smiri, L. *Solid State Sci.* **1999**, *1* (6), 321–329.
- (140) Altman, D. G. *BMJ* **2005**, *331* (7521), 903–903.
- (141) Lemmerer, A. *Acta Crystallogr. C* **2008**, *64* (12), o626–o629.
- (142) Mrad, M. L.; Ben Nasr, C.; Rzaigui, M.; Lefebvre, F. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2006**, *181* (1), 39–51.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------